

EUROFINS IPL Nord SAS



ACCREDITATION
N°1-0264
PORTEE
DISPOIBLE SUR
WWW.COFRAC.FR

Validation de la méthode
iQ-Check™ Listeria monocytogenes

Rapport de synthèse

Etudes comparative et interlaboratoire selon le référentiel
EN ISO 16140

IQLmono - synthèse 2013

Date de validation : 07.04.2005
Date d'extension : 15/12/2006
2^{ème} extension : 09/2007
3^{ème} extension : 01/2009
Numéro d'attestation : BRD 07/10 – 04/05

Etude réalisée par :

EUROFINS IPL Nord
1 rue du Professeur Calmette
59046 LILLE cedex

pour :

Bio-Rad
3, bd Raymond Poincaré
92 430 MARNES LA COQUETTE

1 Introduction

1.1 Référentiels de validation

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

1.2 Rappel sur la méthode alternative

1.2.1 Date de 1^{ère} validation AFNOR et date(s) de reconduction

La méthode iQ-check™ *Listeria monocytogenes* II est validée sous le numéro d'attestation BRD 07/10-04/05 :

- Avril 2005 : validation initiale
- Décembre 2006 : extension à des nouveaux protocoles (bouillon d'enrichissement spécifique, introduction d'un protocole d'extraction d'ADN simplifié)
- Septembre 2007 : extension de la méthode à l'utilisation des thermocycleurs MiniOpticon et iQ5.
- Janvier 2009 : extension à l'utilisation d'un nouveau mélange réactionnel et d'une nouvelle version du logiciel Opticon Monitor, intégrant une analyse automatique

1.2.2 Principe

Le test repose sur l'amplification génique par PCR en temps réel d'une séquence nucléique spécifique de *Listeria monocytogenes*. La détection est possible grâce à une sonde oligonucléotidique spécifique, appelée Molecular Beacon, marquée par un fluorophore (FAM) qui émet sa fluorescence uniquement quand l'hybridation avec les amplicons a lieu. Cette fluorescence est mesurée directement par le module optique du thermocycleur iCycler iQ™ ou système Chromo4™.

*Un ADN synthétique appelé « contrôle interne » est ajouté à chaque réaction et est amplifié en même temps que les séquences cibles de *Listeria monocytogenes*, mais il est détecté par une sonde marquée avec un fluorophore différent de celui de *Listeria monocytogenes*. Il permet de vérifier l'absence d'inhibition de la réaction PCR et de valider un résultat négatif.*

Le logiciel associé à l'appareil iCycler iQ™ ou Chromo4™ calcule automatiquement la relation optique entre l'intensité de fluorescence et le cycle d'amplification.

Les résultats sont visualisés sous forme de courbe qu'il convient d'interpréter afin de déterminer si le résultat est positif ou négatif.

1.2.3 Protocoles

Plusieurs protocoles sont validés :

Essais réalisés en 2005

- un protocole mettant en œuvre le bouillon Fraser ½ et une lyse standard

Essais réalisés en 2006

- un protocole mettant en œuvre un bouillon spécifique (bouillon LSB) et une lyse standard
- un protocole mettant en œuvre un bouillon spécifique (bouillon LSB) et une lyse simplifiée

- un protocole mettant en œuvre le bouillon Fraser ½ et une lyse simplifiée, spécifique des prélèvements d'environnement

Ces différents protocoles sont détaillés ci-après et des schémas sont présentés en annexe A.

1.2.3.1 Protocole validé en 2005 (mise en œuvre du bouillon Fraser ½ et lyse standard)

Les différentes **étapes analytiques** sont les suivantes :

- Enrichissement
25 heures +/- 1 heure à 30°C en bouillon Fraser ½ (1/10)
- Lyse des bactéries pour libérer l'ADN bactérien
- Amplification - détection
avec le thermocycleur iCycler iQ™ ou le système Chromo4™
- Confirmations
Les échantillons positifs à l'issue du test iQ-Check *Listeria monocytogenes* sont confirmés :
 - 1) selon les tests des méthodes normalisées, après isolement du bouillon d'enrichissement sur géloses sélectives telles que la gélose *Listeria* selon Ottaviani et Agosti ou des géloses PALCAM ou Oxford
 - 2) par étalement-isolement de 0,1 ml de bouillon Fraser ½ sur gélose RAPID'L.mono
En cas de présence de colonies caractéristiques sur RAPID'L.mono, le résultat iQ-Check™ est considéré comme confirmé.

1.2.3.2 Protocoles testés dans l'étude d'extension de 2006 (utilisation du bouillon spécifique LSB)

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

- Enrichissement
24 heures +/- 2 heures à 30°C en bouillon LSB pour le protocole de lyse standard
25 heures +/- 1 heure à 30°C en bouillon LSB pour le protocole de lyse simplifié
- Lyse des bactéries pour libérer l'ADN bactérien
Deux protocoles de lyse bactérienne sont possibles :
 - 1) *Protocole de lyse standard (protocole identique à celui testé lors de l'étude de validation initiale à partir du bouillon Fraser ½)*
 - 2) *Protocole de lyse simplifié*
- Amplification – détection
avec le thermocycleur iCycler iQ™ ou le système Chromo4™
- Confirmations
Identiques à la validation initiale

1.2.3.3 Protocole spécifique aux prélèvements d'environnement, testé lors de l'étude d'extension de 2006

Des inhibitions liées aux prélèvements d'environnement pouvant être observées en bouillon LSB, il est intéressant de disposer d'un protocole alternatif pour ce type d'échantillons.

Le protocole initialement validé avec un bouillon Fraser ½ comme bouillon d'enrichissement existe toujours, mais il met en œuvre le protocole de lyse standard.

Il semblait donc intéressant de tester le protocole de lyse simplifié sur ces échantillons.

Ainsi en plus des enrichissements en bouillon spécifique LSB, les prélèvements d'environnement ont également été testés avec un enrichissement en bouillon Fraser ½, et un protocole de lyse simplifié, avec le protocole d'enrichissement suivant :

- Enrichissement
24 heures +/- 2 heures à 30°C en bouillon Fraser ½,
puis repiquage d'1 mL en bouillon TSB incubé **3 heures à 5 heures à 30°C**, afin de supprimer le risque d'inhibition de la réaction PCR due au bouillon Fraser ½ et aux matrices
- puis,
- Protocole de lyse simplifié des bactéries pour libérer l'ADN bactérien
- Amplification - détection
- Confirmations

1.2.3.4 Nature des essais complémentaires concernant l'extension de Janvier 2009

L'objectif de ces essais était de vérifier que les changements réalisés au niveau de mélange réactionnel n'influençaient pas le résultat final de la méthode. Il s'agissait donc principalement de comparer les données obtenues avec le « mélange réactionnel actuel » par rapport à celles obtenues avec le « mélange réactionnel modifié ».

L'analyse des données obtenues s'est faite sur des échantillons contaminés par *Listeria monocytogenes*, d'une part à partir d'extraits d'ADN générés lors de l'étude d'extension de 2006 et d'autre part, à partir d'extraits d'ADN nouvellement générés pour cette étude (étude réalisée par BIO-RAD pour les extraits d'ADN générés lors de l'étude d'extension de 2006 et par le laboratoire expert pour l'analyse de nouveaux échantillons)

1.3 Domaine d'application demandé

Les protocoles décrits ci-dessus (§1.2.3.1 et §1.2.3.2) s'appliquent à tous produits d'alimentation humaine, ainsi que les prélèvements d'environnement.

En parallèle, un protocole spécifique pour les prélèvements d'environnement a également été développé.

1.4 Méthode de référence

L'étude de validation a été réalisée par rapport à la méthode de référence ISO 11290-1/A1 : 2004 : « Méthode horizontale pour la recherche de *Listeria monocytogenes* »

2 Etude comparative

Les critères suivants ont été déterminés pour les différents protocoles existants :

- exactitude, spécificité et sensibilité relatives
- niveau de détection relatif
- spécificité : inclusivité et exclusivité

De plus, les critères de praticabilité ont été établis selon les exigences AFNOR.

2.1 Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative

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

- la méthode de référence ISO 11290-1 :2004,
 - la méthode iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* (BIO-RAD),
- sur des échantillons contaminés et non contaminés en *Listeria monocytogenes*.

2.1.1 Nombre et nature des échantillons

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

2.1.1.1 Essais réalisés en 2005 (protocole Fraser ½ + lyse standard)

Catégories	Types	Positifs*	Négatifs	Total
Produits carnés	Viandes crues	11	22	33
	Viandes préparées & assaisonnées (crués)	6	13	19
	Charcuteries	14	10	24
	Total	31	45	76
Produits laitiers	Fromages au lait cru de vache	11	16	27
	Fromages au lait cru de chèvre/brebis	10	11	21
	Divers : laits crus, pâtisseries	9	9	18
	Total	30	36	66
Produits de la pêche	Poissons fumés	14	9	23
	Poissons crus	9	14	23
	Poissons préparés et crustacés	9	8	17
	Total	32	31	63
Produits végétaux	Végétaux crus	8	10	18
	Végétaux surgelés	8	9	17
	Végétaux cuisinés et assaisonnés	15	11	26
	Total	31	30	61
Environnement	Eaux diverses	16	8	24
	Prélèvements de surface	15	17	32
	Résidus	6	15	21
	Total	37	40	77
TOTAL		161	182	343

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

2.1.1.2 Essais réalisés en 2006 (extension)

Catégories	Types	Positifs*	Négatifs	Total
Produits carnés	crus	14	10	24
	crus et préparés, prêts à cuire	17	5	22
	charcuteries, plats cuisinés, ...	7	17	24
	Total	38	32	70
Produits laitiers	fromages au lait de vache	14	14	28
	fromages au lait de chèvre ou de brebis	8	10	18
	desserts, poudres de lait, laits crus	14	7	21
	Total	36	31	67
Produits de la pêche	filets de poissons frais et crustacés	16	11	27
	poissons fumés	11	10	21
	plats cuisinés à base de poisson	9	11	20
	Total	36	32	68
Produits végétaux	surgelés	10	5	15
	frais ou 4ème gamme	10	10	20
	légumes cuits, préparés	11	16	27
	Total	31	31	62
Environnement	eaux diverses	5	6	11
	prélèvements de surface	16	18	34
	résidus	9	7	16
	Total	30	31	61
TOTAL		171	157	328

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

2.1.1.3 Essais réalisés en 2008 (extension de Janvier 2009)

Catégories	Echantillons ayant générés des extraits en 2008			Echantillons dont les extraits d'ADN de 2006 ont été analysés			Cumul des deux études		
	Positifs*	Négatifs	Total	Positifs*	Négatifs	Total	Positifs*	Négatifs	Total
Produits carnés	8	20	28	23	17	40	31	37	68
Produits laitiers	15	18	33	19	24	43	34	42	76
Produits de la pêche	18	17	35	13	20	33	31	37	68
Produits végétaux	13	9	19	18	21	39	31	30	61
Environnement	22	9	27	12	21	33	34	30	64
TOTAL	76	73	149	85	103	188	161	176	337

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

2.1.2 Contamination artificielle des échantillons et pourcentage

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

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

Etude réalisée en 2005

Les produits ont été contaminés par ces souches stressées à des taux variant de 1 à 12 cellules par 25 grammes, en fonction des souches utilisées. Huit souches de *Listeria monocytogenes* d'origine et de sérotype différents ont été utilisées pour réaliser ces contaminations artificielles.

Au total, 38 résultats positifs sur 161 ont été obtenus suite à des contaminations artificielles, soit 24%.

Etude réalisée en 2006

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

Au total, 30 résultats positifs sur 171 résultats ont été obtenus suite à des contaminations artificielles, soit 18%.

Etude réalisée en 2008

Au total 45 % des résultats positifs ont été obtenus suite à des contaminations artificielles.

2.1.3 Résultats des essais

2.1.3.1 Essais réalisés en 2005 (protocole Fraser ½ + lyse standard)

Les résultats obtenus pour les 343 échantillons analysés se répartissent de la manière suivante.

Il est à noter qu'aucun cas d'inhibition n'a été observé sur l'ensemble des résultats obtenus.

	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)	Total
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 155	Déviations positives (R-/A+) PD = 2	157
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 4⁽¹⁾	Accord négatif (A-/R-) NA = 182⁽²⁾	186
Total	159	184	343

Légende :

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 9 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

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

2.1.3.2 Essais réalisés en 2006 (extension)

Les résultats obtenus pour les 328 échantillons analysés se répartissent de la manière suivante.

1) Résultats obtenus avec le bouillon LSB incubé 22 heures et un protocole de lyse standard (ensemble des catégories)

	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)	Total
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 138	Déviations positives (R-/A+) PD = 22	160
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 11⁽³⁾	Accord négatif (A-/R-) NA = 157⁽⁴⁾	168
Total	149	179	328

Légende :

A+ = positifs confirmés

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

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

(4) : dont 7 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

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

2) Résultats obtenus avec le bouillon LSB incubé 24 heures et un protocole de lyse simplifié (ensemble des catégories)

	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)	Total
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 135	Déviations positives (R-/A+) PD = 21	156
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 14⁽⁵⁾	Accord négatif (A-/R-) NA = 158⁽⁶⁾	172
Total	149	179	328

Légende :

A+ = positifs confirmés

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

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

(6) : dont 4 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

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

3) Résultats obtenus pour le protocole spécifique « prélèvements d'environnement » (bouillon Fraser 1/2 + bouillon TSB et protocole de lyse simplifié)

	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)	Total
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 30	Déviations positives (R-/A+) PD = 0	30
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 0	Accord négatif (A-/R-) NA = 31⁽⁷⁾	31
Total	30	31	61

Légende :

A+ = positifs confirmés

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

(7) : dont 2 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

2.1.3.3 Essais réalisés en 2008 (extension)

	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)	Total
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 138	Déviations positives (R-/A+) PD = 17	155
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 6	Accord négatif (A-/R-) NA = 176	182
Total	144	193	337

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

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

- 1) Résultats obtenus avec le bouillon Fraser 1/2 et un protocole de lyse standard (ensemble des catégories)

Catégorie	PA	NA	ND	PD	Somme N	Exactitude relative AC (%) [100x(PA+NA)]/N	N+ PA + ND	Sensibilité relative SE (%) [100xPA]/N+	N- NA + PD	Spécificité relative SP (%) [100xNA]/N-
Produits carnés	29	45	1	1	76	97,4	30	96,7	46	97,8
Produits laitiers	30	36	0	0	66	100	30	100	36	100
Produits pêche	29	31	3	0	63	95,2	32	90,6	31	100
Végétaux	30	30	0	1	61	98,4	30	100	31	96,8
Environnement	37	40	0	0	77	100	37	100	40	100
TOTAL	155	182	4	2	343	98,3	159	97,5	184	98,9

- 2) Résultats obtenus avec le bouillon LSB incubé 22 heures et un protocole de lyse standard (ensemble des catégories)

Catégorie	PA	NA	ND	PD	Somme N	Exactitude relative AC (%) [100x(PA+NA)]/N	N+ PA + ND	Sensibilité relative SE (%) [100xPA]/N+	N- NA + PD	Spécificité relative SP (%) [100xNA]/N-
Produits carnés	23	32	4	11	70	78,6	27	85,2	43	74,4
Produits laitiers	31	31	2	3	67	92,5	33	93,9	34	91,2
Pêche	30	32	1	5	68	91,2	31	96,8	37	86,5
Végétaux	26	31	2	3	62	91,9	28	92,9	34	91,2
Environnement	28	31	2	0	61	96,7	30	93,3	31	100
TOTAL	138	157	11	22	328	89,9	149	92,6	179	87,7

3) Résultats obtenus avec le bouillon LSB incubé 24 heures et un protocole de lyse simplifié (ensemble des catégories)

Catégorie	PA	NA	ND	PD	Somme N	Exactitude relative AC (%) [100x(PA+NA)]/N	N+ PA + ND	Sensibilité relative SE (%) [100xPA]/N+	N- NA + PD	Spécificité relative SP (%) [100xNA]/N-
Produits carnés	23	33	4	10	70	80,0	27	85,2	43	76,7
Produits laitiers	29	31	4	3	67	89,6	33	87,9	34	91,2
Pêche	29	32	2	5	68	89,7	31	93,5	37	86,5
Végétaux	26	31	2	3	62	91,9	28	92,9	34	91,2
Environnement	28	31	2	0	61	96,7	30	93,3	31	100
TOTAL	135	158	14	21	328	89,3	149	90,6	179	88,3

4) Résultats obtenus pour les prélèvements d'environnement avec les bouillons Fraser ½ -TSB et un protocole de lyse simplifié

Catégorie	PA	NA	ND	PD	Somme N	Exactitude relative AC (%) [100x(PA+NA)]/N	N+ PA + ND	Sensibilité relative SE (%) [100xPA]/N+	N- NA + PD	Spécificité relative SP (%) [100xNA]/N-
Environnement (résultats 2006)	30	31	0	0	61	100	30	100	31	100

5) Résultats obtenus lors des essais réalisés en 2008

Catégorie	PA	NA	ND	PD	Somme N	Exactitude relative AC (%) [100x(PA+NA)]/N	N+ PA + ND	Sensibilité relative SE (%) [100xPA]/N+	N- NA + PD	Spécificité relative SP (%) [100xNA]/N-
résultats 2008	138	176	6	17	337	93,2	144	95,8	193	91,2

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

	<i>Bouillon Fraser ½</i>	<i>Bouillon LSB</i>		<i>Bouillon LSB</i>
	<i>Protocole de lyse standard</i>	<i>Protocole de lyse standard</i>	<i>Protocole de lyse simplifié</i>	<i>Utilisation du nouveau mélange réactionnel</i>
exactitude relative : AC	98,3 %	89,9 %	89,3 %	93,2 %
spécificité relative : SP	98,9 %	87,7 %	88,3 %	91,2 %
sensibilité relative : SE	97,5 %	92,6 %	90,6 %	95,8 %

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

	Méthode alternative :	Méthode de référence :
<i>Bouillon Fraser ½ :</i> <i>Protocole de lyse standard</i>	$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 97,5 \%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 98,6 \%$
<i>Bouillon LSB :</i> <i>Protocole de lyse standard</i>	$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 93,6 \%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 87,1 \%$
<i>Protocole de lyse simplifié</i>	$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 91,8 \%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 87,6 \%$
<i>Bouillon LSB :</i> <i>Nouveau mélange réactionnel</i>	$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 96,3 \%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 89,4 \%$

2.1.5 Analyse des discordances

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

Ce test statistique est mis en œuvre pour la méthode iQ Check™ *Listeria monocytogenes* puisque le nombre de résultats discordants est de :

- 6 avec le bouillon Fraser ½ et le protocole de lyse standard,
- 33 avec le bouillon LSB et le protocole de lyse standard,
- 35 avec le bouillon LSB et le protocole de lyse simplifié,
- 23 avec le bouillon LSB et l'utilisation du nouveau mélange réactionnel.

Rappel : dans le cas du bouillon LSB, la méthode alternative et la méthode de référence utilisent un bouillon d'enrichissement différent et le pourcentage d'échantillons naturellement contaminés est important, ce qui est un facteur influençant fortement le nombre de résultats discordants.

2.1.5.1 Essais réalisés en 2005 (protocole Fraser ½ + lyse standard)

Il s'agit de déterminer M, en fonction du nombre total de discordants et en fonction de la norme ISO 16140 (annexe F) et de comparer M à une valeur m, plus petite des deux valeurs de PD et de ND. Les deux méthodes seront considérées comme équivalentes si $m > M$.

Nombre de résultats discordants	M	m	Conclusion
6	0	2	Equivalence

2.1.5.2 Essais réalisés en 2006 (extension)

NB : pour la catégorie « Prélèvements d'environnement » testés avec le protocole Fraser ½ - TSB, aucune discordance n'a été observée. Les deux méthodes étaient considérées comme équivalentes pour ce protocole spécifique.

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

Il s'agit de déterminer $d = |PD - ND|$ et de comparer d à une valeur de d minimale définie pour chaque nombre de résultats discordants.

Les deux méthodes seront considérées comme différentes si $d \geq d$ minimal.

	Nombre de résultats discordants	d minimal	d	Conclusion
Protocole de lyse standard	33	12	$22 - 11 = 11$	Equivalence
Protocole de lyse simplifié	35	12	$21 - 14 = 7$	Equivalence

La méthode alternative utilisant le bouillon LSB est équivalente à la méthode de référence.

Néanmoins, lors des essais réalisés dans le cadre de cette étude, elle a donné un nombre de positifs supplémentaires confirmés important. Au vu des résultats, nous pouvons conclure qu'elle présente des performances meilleures que celles de la méthode de référence.

2.1.5.3 Essais réalisés en 2008 (extension)

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

Il s'agit de déterminer $d = |PD - ND|$ et de comparer d à une valeur de d minimale définie pour chaque nombre de résultats discordants.

Les deux méthodes seront considérées comme différentes si $d \geq d$ minimal.

Nombre de résultats discordants	d minimal	d	Conclusion
23	10	$17 - 6 = 11$	Non équivalence

La méthode alternative et la méthode de référence ne peuvent pas être considérées comme équivalentes d'un point de vue statistique. Néanmoins, la méthode alternative a donné un nombre de positifs supplémentaires confirmés important. Au vu des résultats, nous pouvons conclure qu'elle présente des performances meilleures que celles de la méthode de référence.

2.1.6 Commentaires sur les inhibitions

Il est à noter qu'aucun cas d'inhibition n'a été observé sur l'ensemble des résultats obtenus avec le protocole Fraser ½ et lyse standard.

Des résultats inhibés ont été obtenus avec le protocole en bouillon LSB.

- 11 résultats inhibés après test iQ Check™ *Listeria monocytogenes* à partir de l'ADN pur ont été observés avec le protocole de lyse standard :
 - un produit carné
 - 4 produits laitiers
 - 2 produits de la pêche
 - un échantillon de produits végétaux
 - 3 prélèvements d'environnement
- 3 résultats inhibés après test iQ Check™ *Listeria monocytogenes* à partir de l'ADN pur ont été observés avec le protocole de lyse simplifié :
 - un échantillon de glace au chocolat
 - 2 prélèvements de surface

Concernant le protocole avec l'utilisation du nouveau mélange réactionnel,

- 4 inhibitions ont disparu avec le nouveau mix
 - un produit laitier
 - un prélèvement d'environnement
 - un produit de la pêche
 - un produit carné
- une inhibition est apparue avec le nouveau mix qui concerne un prélèvement d'environnement
- une inhibition persiste quel que soit le mix utilisé, elle concerne un produit laitier

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

2.1.7 Commentaires sur le protocole de confirmation

2.1.7.1 Essais réalisés en 2005 (protocole bouillon Fraser ½)

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

- 1) selon le protocole de la méthode de référence (isolement du bouillon Fraser ½ sur géloses sélectives 'Agar *Listeria* selon Ottaviani et Agosti' et PALCAM et ensemencement d'un bouillon Fraser complet suivi, le cas échéant, des isolements sur géloses sélectives, puis identification des colonies caractéristiques)
- 2) par étalement-isolement sur gélose RAPID'*L.mono* : en cas de présence de colonies caractéristiques sur RAPID'*L.mono*, le résultat iQ-Check est considéré comme confirmé.

1) voie méthode de référence

Les confirmations réalisées à partir du bouillon Fraser ½ sur les géloses utilisées dans le cadre de la méthode de référence (PALCAM et Agar *Listeria* inoculées avec une öse calibrée de 10µl) ont majoritairement permis de retrouver *Listeria monocytogenes*.

Néanmoins, pour six échantillons, *Listeria monocytogenes* n'a été mise en évidence sur aucune des trois géloses après Fraser ½, mais a été trouvée après Fraser complet.

Pour d'autres échantillons, *Listeria monocytogenes* n'a été mise en évidence que sur certains milieux ensemencés à partir du bouillon Fraser ½, mais elle a été retrouvée sur les trois milieux après Fraser complet.

Ainsi, *Listeria monocytogenes* n'a pas été trouvée, après l'incubation du bouillon Fraser ½, sur :

- gélose PALCAM pour 8 échantillons,
- gélose Agar *Listeria* pour 6 échantillons,
- gélose ALOA® pour 8 échantillons.

2) voie RAPID'L.mono

La confirmation d'un test iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* a également été réalisée par étalement-isolement de 100 µl de bouillon Fraser ½ sur gélose chromogène RAPID'L.mono.

Sur les 157 résultats positifs confirmés obtenus par la méthode alternative, seul un résultat n'a pas été confirmé sur gélose RAPID'L.mono. Il s'agit d'un échantillon de « lardons fumés » qui n'a été retrouvé positif que sur les isolements réalisés sur gélose PALCAM et pas sur gélose Agar *Listeria* selon Ottaviani et Agosti.

Il est à noter que les deux échantillons positifs supplémentaires sont dus à la présence de colonies caractéristiques de *Listeria monocytogenes*, identifiées comme telles, sur gélose RAPID'L.mono uniquement.

2.1.7.2 Essais réalisés en 2006 (protocole bouillon LSB)

Les échantillons positifs à l'issue du test iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* sont confirmés par isolement du bouillon LSB sur gélose RAPID'L.mono : en cas de présence de colonies caractéristiques sur RAPID'L.mono, le résultat iQ-Check est considéré comme confirmé.

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

Pour un échantillon de lardons de saumon fumé, une incubation de la gélose RAPID'L.mono pendant 48 heures a été nécessaire afin de visualiser les colonies bleues caractéristiques de *Listeria monocytogenes*.

Dans un seul cas, un repiquage du bouillon LSB en bouillon Fraser, avant isolement sur gélose RAPID'L.mono s'est avéré nécessaire pour retrouver *Listeria monocytogenes* : il s'agit d'un échantillon d'églefin fumé également contaminé en *Listeria innocua* où seules des *Listeria innocua* avaient été retrouvées lors du premier isolement (pas de présence de colonies bleues).

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

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

Les bouillons LSB ont été conservés 72 heures à 2-8°C et un second test iQ Check™ *Listeria monocytogenes* a été réalisé. Quelques résultats sont différents :

Résultats faux positifs :

- un produit carné et un prélèvement d'environnement, négatifs, deviennent faux positifs, et
- un produit de la pêche faux positif en lyse simplifiée devient négatif concordant,
- un prélèvement d'environnement faux positif en lyse standard devient négatif concordant.

Résultats faux négatifs :

- un produit laitier faux négatif en lyse simplifiée et concordant positif en lyse standard, devient concordant positif
- un produit laitier positif devient faux négatif

Inhibitions :

- deux tests iQ Check™ *Listeria monocytogenes* présentent des inhibitions, alors que les résultats étaient positifs en ADN pur lorsque le test avait été réalisé directement après incubation du bouillon LSB.
- l'échantillon de glace au chocolat ne présente plus d'inhibition en protocole de lyse simplifiée

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

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

Différents couples 'matrice alimentaire-souche' ont été étudiés en parallèle avec la méthode de référence et la méthode iQ-Check™ *Listeria monocytogenes*, pour cinq catégories.

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

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

1) Essais réalisés en 2005 (protocole bouillon Fraser ½)

Matrice	Souche	Niveau de détection relatif de la méthode de référence (UFC / 25 g ou 25 mL)	Niveau de détection relatif de la méthode alternative (UFC / 25 g ou 25 mL)
Rillettes artisanales	<i>L.monocytogenes</i> 1/2 c	0,7 [0,4 – 1,2]	0,7 [0,4 – 1,2]
Lait cru	<i>L.monocytogenes</i> 1/2 b	0,5 [0,3 – 0,8]	0,5 [0,3 – 0,8]
Saumon fumé	<i>L.monocytogenes</i> 1/2 a	0,3 [0,2 – 0,5]	0,3 [0,2 – 0,5]
Mélange chou, maïs, salade	<i>L.monocytogenes</i> 4b	0,9 [0,5 – 1,6]	0,9 [0,5 – 1,6]
Eau de process	<i>L.monocytogenes</i> 1/2 c	0,6 [0,3 – 0,8]	0,6 [0,3 – 0,8]

Conclusion

Le niveau de détection obtenu pour la méthode alternative est compris entre 0,2 et 1,6 cellules par 25 grammes et est identique à celui de la méthode de référence.

2) Essais réalisés en 2006 (protocole bouillon LSB)

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

Conclusion

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

3) Essais réalisés en 2006 pour les prélèvements d'environnement avec les bouillons Fraser ½ -TSB et un protocole de lyse simplifié

Matrice	Souche	Niveau de détection relatif de la méthode de référence (UFC / 25 g ou 25 mL)	Niveau de détection relatif de la méthode alternative (UFC / 25 g ou 25 mL)
Eau de process	<i>L.monocytogenes</i> 1/2c	0,6 [0,3 – 1,1]	0,6 [0,3 – 1,1]

Conclusion

Le niveau de détection relatif pour les prélèvements d'environnement par le nouveau protocole Fraser ½, suivi de TSB et d'un protocole de lyse simplifié est identique à celui de la méthode de référence : il est compris entre 0,3 et 1,1 cellules par 25 mL. Il est également très proche de celui obtenu lors des essais réalisés en 2005 sur cette catégorie, avec le protocole de lyse standard : il se situait entre 0,3 et 0,8 cellules par 25 mL.

4) Essais réalisés en 2008 avec l'utilisation du nouveau mélange réactionnel

Trois souches *Listeria monocytogenes* (*Listeria monocytogenes* 1/2a, *Listeria monocytogenes* 1/2b et *Listeria monocytogenes* 4b) ont été mises en culture en bouillon TCS à 37°C, puis diluées à une concentration proche de la limite de détection de la méthode iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* II (soit 10²-10³ CFU/ml).

Dix extractions selon le protocole standard décrit dans la notice iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* II ont été réalisées. Les extraits d'ADN ont été mélangés.

30 réplicats ont été passés en PCR avec le mélange réactionnel modifié et avec le mélange réactionnel actuel.

* "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".

Les résultats obtenus pour les répliqués analysés sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Souche	Concentration de la culture pure (CFU/ml)	Nombre de Positifs/ Nombre de répliqués PCR					
		Analyse manuelle			Analyse automatique		
		Mix actuel	Mix modifié	χ^2	Mix actuel	Mix modifié	χ^2
<i>L.monocytogenes</i> 1/2a	112 CFU/ml	26/30	24/30	0,48	26/30	23/30	1
<i>L.monocytogenes</i> 1/2b	147 CFU/ml	10/30	10/30	-	10/30	10/30	-
<i>L.monocytogenes</i> 4b	149 CFU/ml	10/30	15/30	1,71	10/30	15/30	1,71

Un test statistique (test X^2) a été réalisé pour valider si la proportion de positifs et négatifs est similaire avec les deux mélanges réactionnels PCR (ref : Bouyer, 2000. In : Méthodes statistiques, médecine, biologie).

Pour les souches *Listeria monocytogenes* 1/2a et 4b, les χ^2 sont inférieurs à 3,84.

La proportion de positifs et négatifs est donc statistiquement similaire avec les deux mélanges réactionnels PCR pour une concentration bactérienne proche de la limite de détection de la méthode iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* II.

Pour la souche de *Listeria monocytogenes* 1/2b, la proportion de positifs et négatifs est identique avec les deux mélanges réactionnels PCR.

2.3 Inclusivité / exclusivité

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

2.3.1 Protocoles d'essai

2.3.1.1 Protocole pour l'inclusivité

Pour chacune des souches de *Listeria monocytogenes*, une culture en bouillon nutritif a été réalisée.

Trois protocoles ont ensuite été réalisés :

- inoculation d'un bouillon Fraser ½ avec environ 10 *Listeria monocytogenes* par 225mL incubé à 30°C pendant 24 heures, suivi du protocole de lyse standard et du test iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* (essais 2005)
- inoculation d'un bouillon LSB avec environ 10 *Listeria monocytogenes* par 225mL incubé à 30°C pendant 24 heures, suivi du protocole de lyse simplifié et du test iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* (essais 2006)
- inoculation d'un bouillon Fraser ½ avec environ 10 *Listeria monocytogenes* par 225mL incubé à 30°C pendant 22 heures, suivi d'un enrichissement secondaire en bouillon TSB, puis du protocole de lyse simplifié et du test iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* (essais 2006)

Concernant les essais de 2008 réalisés avec le nouveau mix, un bouillon LSB a ensuite été inoculé avec environ 10 *Listeria* par mL et incubé à 30°C pendant 24 heures et le protocole de lyse standard a été réalisé.

A l'issue de la lyse, le test iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* II a été réalisé avec le mélange réactionnel modifié.

2.3.1.2 Protocole pour l'exclusivité

Lors des essais réalisés en 2005, les différentes souches négatives ont été cultivées en bouillons nutritifs, puis

- ensemencées en bouillons Fraser ½ pour les souches de *Listeria non monocytogenes*,
 - ensemencées en bouillons nutritifs, non sélectifs, pour les souches de non *Listeria*,
- afin d'obtenir des niveaux d'environ 10^5 cellules par ml.

Le protocole de lyse standard et le test ont ensuite été réalisés à partir des bouillons préalablement incubés 24 heures à 30°C.

Lors des essais de 2006, toutes les souches négatives ont été cultivées en bouillon nutritif pendant 24 heures à 30°C, ensemencées dans 10 ml de bouillon nutritif afin d'obtenir des niveaux d'environ 10^5 cellules par ml, puis incubées pendant 24 heures à 30°C avant réalisation du protocole de lyse simplifié et du test iQ-Check™ *Listeria monocytogenes*.

Concernant les essais de 2008 réalisés avec le nouveau mix, les différentes souches négatives ont été cultivées en bouillon nutritif pendant 24 heures à 30°C, ensemencées dans 10 ml de bouillon nutritif afin d'obtenir des niveaux

d'environ 10⁵ cellules par ml, puis incubées pendant 24 heures à 30°C avant réalisation du protocole de lyse standard.

A l'issue de la lyse, le test iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* II a été réalisé avec le mélange réactionnel modifié.

2.3.2 Résultats

Les résultats figurent en annexe D.

Les 50 souches de *Listeria monocytogenes*, testées lors des deux études, ont toutes répondu positivement au test iQ-Check™ *Listeria monocytogenes*.

16 souches de *Listeria non monocytogenes* en 2005 et 22 souches de *Listeria non monocytogenes* en 2006 ont toutes répondu négativement.

Avec le protocole de lyse standard réalisé après une culture en bouillon nutritif, parmi les 17 souches autres que *Listeria* testées en 2005, une souche d'*Enterococcus faecium* a donné un résultat positif après culture en bouillon nutritif. Un deuxième essai avec cette même souche a donné le même résultat.

Cette souche a donc été testée en utilisant le protocole complet de la méthode alternative, c'est-à-dire en substituant le bouillon nutritif, non sélectif, par un bouillon Fraser ½. Le test s'est révélé négatif.

En parallèle, les milieux 'Agar *Listeria* selon Ottaviani et Agosti' et PALCAM ont été ensemencés (méthode de référence) et aucune culture n'a été observée sur les géloses sélectives. En revanche des colonies étaient présentes sur gélose non sélective TSAYE.

D'autre part, une seconde souche d'*Enterococcus faecium* a été testée et a donné un résultat négatif, de même que deux souches d'*Enterococcus faecalis*.

14 souches autres que *Listeria* ont été testées en 2006, suite à une culture en bouillon nutritif et un protocole de lyse simplifié. Elles ont toutes répondu négativement au test, y compris les souches d'*Enterococcus faecium* testées.

Pour les essais réalisés avec le nouveau mélange réactionnel, les 56 souches de *Listeria monocytogenes* testées ont toutes répondu positivement et les 34 souches non cibles (*Listeria non monocytogenes* et souches d'autres genres) n'ont pas donné de réaction croisée.

2.4 Evolution de la version du logiciel Opticon Monitor™

Une seconde étude a été réalisée en parallèle suite à l'**évolution du logiciel Opticon Monitor™**. La société Bio-Rad a développé une version modifiée de ce logiciel intégrant une option de retraitement automatique des résultats (le retraitement manuel des résultats étant toujours possible avec cette nouvelle version, comme pour la version précédente).

A cette fin, tous les résultats PCR obtenus lors des essais complémentaires de cette étude d'extension ont été traités en parallèle en analyse manuelle et en analyse automatique du logiciel Opticon Monitor™.

L'option de retraitement automatique des résultats permet d'obtenir les mêmes résultats que ceux déterminés via l'analyse manuelle, mais de façon beaucoup plus rapide et simple.

3 Etude interlaboratoire

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

Les laboratoires participant ont réalisé l'analyse selon la méthode iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* (protocole en bouillon Fraser ½ et lyse standard) et selon la méthode de référence, en 2005.

3.1 Organisation

- Nombre de laboratoires participants

15 laboratoires étaient destinataires des échantillons.

- Matrice utilisée

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

La flore naturelle présente dans la matrice est de l'ordre $4,1 \cdot 10^1$ cellules par mL.

- Souche utilisée

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

- Nombre d'échantillons par laboratoire

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

3.2 Contrôle des paramètres expérimentaux

3.2.1 Taux de contamination obtenus après contamination artificielle

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

Niveau	Echantillons	Taux théorique ciblé (b/25ml)	Taux réel (b/25ml)	Estimation de la limite inférieure de la contamination par 25ml d'échantillon	Estimation de la limite supérieure de la contamination par 25ml d'échantillon
Niveau 0	1-4-7-10-13-16-19-22	0	0		
Niveau bas	2-5-8-11-14-17-20-23	3	4,4	3	5
Niveau haut	3-6-9-12-15-18-21-24	30	42,4	36	49

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

Les températures à réception obtenues par les laboratoires variaient de 0,1°C à 4,9°C.

Elles étaient conformes aux exigences (entre 0°C et 8°C) pour les 15 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.

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

Tous les laboratoires ont reçu les échantillons le lendemain de leur envoi

Les températures à réception, annoncées par les laboratoires, étaient conformes aux exigences (entre 0°C et 8°C) pour 13 d'entre-eux.

Un laboratoire nous avait signalé une température à réception de 9,0°C. Après analyse de la courbe d'enregistrement des températures, la température du colis à réception serait plutôt autour de 4°C.

Les conditions de réception des échantillons sont donc validées et les analyses de ce laboratoire ont été exploitées.

Un laboratoire n'a finalement pas réalisé les analyses suite à un problème d'organisation survenu le jour de la réception des échantillons.

3.3 Résultats des analyses

3.3.1 Résultats obtenus par les laboratoires collaborateurs

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

Résultats positifs obtenus par la méthode de référence

Laboratoires	Niveaux de contamination					
	L0		L1		L2	
	Obtenu	Nb échantillons	Obtenu	Nb échantillons	Obtenu	Nb échantillons
Laboratoire A	0	8	8	8	8	8
Laboratoire B	0	8	8	8	8	8
Laboratoire C	0	8	8	8	8	8
Laboratoire D	0	8	8	8	8	8
Laboratoire E	0	8	8	8	8	8
Laboratoire F	0	8	8	8	8	8
Laboratoire G	0	8	8	8	8	8
Laboratoire H	0	8	8	8	8	8
Laboratoire I	0	8	8	8	8	8
Laboratoire J	0	8	8	8	8	8
Laboratoire K	0	8	8	8	8	8
Laboratoire L	0	8	8	8	8	8
Laboratoire M	1	8	7	8	8	8
Laboratoire N	0	8	8	8	8	8
Total	1	112	111	112	112	112

Résultats positifs obtenus par la méthode alternative

Laboratoires	Niveaux de contamination					
	L0		L1		L2	
	Obtenu	Nb échantillons	Obtenu	Nb échantillons	Obtenu	Nb échantillons
Laboratoire A	0	8	8	8	8	8
Laboratoire B	0	8	8	8	8	8
Laboratoire C	0	8	8	8	8	8
Laboratoire D	0	8	8	8	8	8
Laboratoire E	0	8	7	8	8	8
Laboratoire F	0	8	8	8	8	8
Laboratoire G	0	8	8	8	8	8
Laboratoire H	0	8	8	8	8	8
Laboratoire I	0	8	8	8	8	8
Laboratoire J	0	8	8	8	8	8
Laboratoire K	0	8	8	8	8	8
Laboratoire L	0	8	8	8	8	8
Laboratoire M	1	8	7	8	8	8
Laboratoire N	0	8	8	8	8	8
Total	1	112	110	112	112	112

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

14 laboratoires ont réalisé les analyses.

D'une manière générale, les résultats obtenus par la méthode alternative après confirmation, pour les 14 laboratoires retenus, sont **concordants** avec ceux obtenus avec la méthode de référence.

Un laboratoire a retrouvé un des échantillons contaminés au faible taux, positif par la méthode de référence et, négatif par la méthode alternative. Ce laboratoire a retesté l'extrait d'ADN et son résultat est devenu largement positif.

Un laboratoire a retrouvé un des échantillons contaminés au faible taux, négatif par les deux méthodes et un échantillon non contaminé, positif par les deux méthodes (sur AL uniquement dans la méthode de référence et après confirmation sur gélose RAPID'L.mono dans 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	120	112	112	111	111	1	1
1	120	112	112	1	2	111	110
2	120	112	112	0	0	112	112

* un laboratoire n'a pas réalisé les analyses

3.4 Calculs

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

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

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

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

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

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

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

Les résultats sont repris dans le tableau ci-dessous :

	Méthode de référence		Méthode alternative	
		LCL*		LCL*
Niveau L0	SP = 99,1%	98%	SP = 99,1%	98%
Niveau L1	SE = 99,1%	98%	SE = 98,2%	96%
Niveau L2	SE = 100%	98%	SE = 100%	98%
Niveaux L1 et L2	SE = 99,6%	98%	SE = 99,1%	98%

* LCL : low critical limit

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

L'exactitude relative est calculée selon la formule suivante :

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

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

	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)	Total
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 223	Déviations positive (R-/A+) PD = 0	(N+) = 223
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négative (A-/R+) ND = 1	Accord négatif (A-/R-) NA = 112 ⁽¹⁾	(N-) = 113
Total	(N+) = 224	(N-) = 112	N = 336

(1) dont 5 échantillons donnés positifs par le test et retrouvés négatifs après confirmation

Dans cette étude, l'exactitude relative est de 99,7%.

3.4.3 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
- il est à noter que deux résultats sont discordants par rapport aux résultats attendus, mais concordants entre les deux méthodes

3.5 Interprétation

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

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

	Etude interlaboratoire	Etude préliminaire (protocole utilisé dans l'étude interlaboratoire)
Exactitude relative (AC)	99,7%	98,3%
Sensibilité (SE)	99,1%	97,5%
Spécificité (SP)	99,1%	98,9%

Les valeurs obtenues suite à l'étude collaborative sont comparables à celles obtenues lors de l'étude préliminaire.

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

	Méthode alternative :	Méthode de référence :
sensibilité	$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 99,6 \%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 100 \%$

3.5.2 Degré d'accord (DA)

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

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

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

	Méthode de référence	Méthode alternative
Niveau L0	DA = 98%	DA = 98%
Niveau L1	DA = 98%	DA = 97%
Niveau L2	DA = 100%	DA = 100%

3.5.3 Concordance

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

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

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

	Méthode de référence	Méthode alternative
Niveau L0	Concordance = 98,2%	Concordance = 98,2%
Niveau L1	Concordance = 98,2%	Concordance = 96,5%
Niveau L2	Concordance = 100%	Concordance = 100%

3.5.4 Odds ratio (COR)

Il est calculé selon la formule suivante :

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

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

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

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

4 Praticabilité

La praticabilité est étudiée en fonction des 13 critères définis par le bureau technique en comparant la méthode de référence à la méthode IQ-Check™ *Listeria monocytogenes* (BIO-RAD).

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

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

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

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

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

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

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

Pour la méthode alternative utilisant l'option 2 de confirmation, les confirmations nécessitent moins de temps : l'isolement sur gélose RAPID'*L.mono* suffit en général à confirmer le résultat du test iQ-Check™ *Listeria monocytogenes*.

9. Délai d'obtention des résultats

échantillons négatifs :

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

* si isolement sur RAPID'*L.mono*

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

échantillons positifs :

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

10. Type de qualification de l'opérateur	L'utilisateur doit être formé aux bonnes pratiques de laboratoire de microbiologie alimentaire et de biologie moléculaire.
11. Étapes communes avec la méthode de référence	Le cas échéant, étape d'enrichissement en bouillon Fraser ½
12. Traçabilité des résultats d'analyse	L'ensemble des résultats est sauvegardé sous forme de fichiers informatiques. Les résultats peuvent être repris dans des tableurs ou des LIMS.
13. Maintenance par le laboratoire	Il est recommandé de vérifier l'alignement du masque dans le logiciel à des intervalles réguliers de 6 mois, et de refaire l'alignement lors d'un déplacement du thermocycleur iCycler iQ. Un contrat de maintenance et une assistance téléphonique client sont à la disposition des utilisateurs du iCycler iQ ou du système Chromo4.

5 Conclusion

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

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

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

L'étude de validation initiale a permis l'étude d'un protocole d'enrichissement en bouillon Fraser ½ suivi d'un protocole de lyse standard.

Les performances de la méthode iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* sont équivalentes à celles à la méthode de référence EN ISO 11290-1/A1. Elles ont été déterminées par l'analyse de 343 échantillons répartis dans cinq catégories de produits.

L'exactitude relative obtenue est de 98,3%, la sensibilité relative de 97,5% et la spécificité relative de 98,9%.

Six échantillons ont donné des résultats discordants par rapport à la méthode de référence : quatre échantillons faux négatifs et deux échantillons positifs supplémentaires confirmés.

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

La spécificité de la méthode iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* est bonne puisque toutes les souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées (inclusivité) et aucune réaction croisée n'a été observée parmi les souches non *Listeria monocytogenes* testées (exclusivité) lorsque le protocole de la méthode est appliqué dans son ensemble.

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

Les performances de la méthode iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* sont équivalentes à celles à la méthode de référence NF EN ISO 11290-1/A1 : 2005. Elles ont été déterminées par l'analyse de 328 échantillons répartis dans cinq catégories de produits.

Les résultats d'exactitude relative, sensibilité relative et spécificité relative sont les suivants :

1) Protocole de lyse standard

L'exactitude relative obtenue est de 89,9%, la sensibilité relative de 92,6% et la spécificité relative de 87,7%, selon les calculs demandés par la norme EN ISO 16140.

33 résultats discordants ont été obtenus : 22 résultats positifs supplémentaires et 11 résultats faux négatifs.

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

- 93,6% de sensibilité pour la méthode alternative,
- 87,1% de sensibilité pour la méthode de référence.

2) Protocole de lyse simplifié

L'exactitude relative obtenue est de 89,3%, la sensibilité relative de 90,6% et la spécificité relative de 88,3%, selon les calculs demandés par la norme EN ISO 16140.

35 résultats discordants ont été obtenus : 21 résultats positifs supplémentaires et 14 résultats faux négatifs.

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

- 91,8% de sensibilité pour la méthode alternative,
- 87,6% de sensibilité pour la méthode de référence.

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

Il est compris entre 0,2 et 1,2 cellules par 25 grammes ou 25 mL, contre 0,3 et 1,1 cellules par 25 grammes ou 25 mL pour la méthode de référence.

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

Dans l'étude d'exclusivité, aucune réaction croisée n'a été observée, ni avec *Listeria* autres que *monocytogenes*, ni avec les souches d'autres genres testées.

D'autre part, le protocole de lyse simplifié a également été étudié après un bouillon Fraser ½ dans le cas particulier des prélèvements d'environnement.

Les pourcentages d'exactitude relative, de sensibilité relative et de spécificité relative sont de 100% puisque aucune discordance avec la méthode de référence n'a été observée.

Le niveau de détection relatif pour les prélèvements d'environnement par le nouveau protocole Fraser ½, suivi de TSB et d'un protocole de lyse simplifié est identique à celui de la méthode de référence : il est compris entre 0,3 et 1,1 cellules par 25 mL.

La spécificité de ce protocole est également satisfaisante puisque toutes les souches de *Listeria monocytogenes* ont été détectées (inclusivité).

Des essais complémentaires ont été réalisés en 2008 suite à l'utilisation d'un nouveau mélange réactionnel et d'une nouvelle version du logiciel Opticon Monitor, intégrant une analyse automatique.

Les performances de la méthode iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* ne sont pas équivalentes à celles à la méthode de référence NF EN ISO 11290-1/A1 : 2005. Elles ont été déterminées par l'analyse de 337 échantillons répartis dans cinq catégories de produits.

L'exactitude relative obtenue est de 93,2%, la sensibilité relative de 91,2% et la spécificité relative de 95,8%.

23 échantillons ont donné des résultats discordants par rapport à la méthode de référence : 6 échantillons faux négatifs et 17 échantillons positifs supplémentaires confirmés.

D'après le protocole standard décrit dans la notice iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* II, la proportion de positifs et négatifs est statistiquement similaire avec les deux mélanges réactionnels PCR pour une concentration bactérienne proche de la limite de détection de la méthode iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* II (pour les souches *Listeria monocytogenes* 1/2a et 4b).

Pour la souche de *Listeria monocytogenes* 1/2b, la proportion de positifs et négatifs est identique avec les deux mélanges réactionnels PCR.

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

Dans l'étude d'exclusivité, aucune réaction croisée n'a été observée, ni avec *Listeria* autres que *monocytogenes*, ni avec les souches d'autres genres testées.

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

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

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

Les délais d'obtention des résultats négatifs sont également intéressants : 24 heures pour un résultat négatif et à partir de 48 heures pour un résultat positif s'il est confirmé sur gélose RAPID'*L.mono* contre 5 à 12 jours pour la méthode de référence.

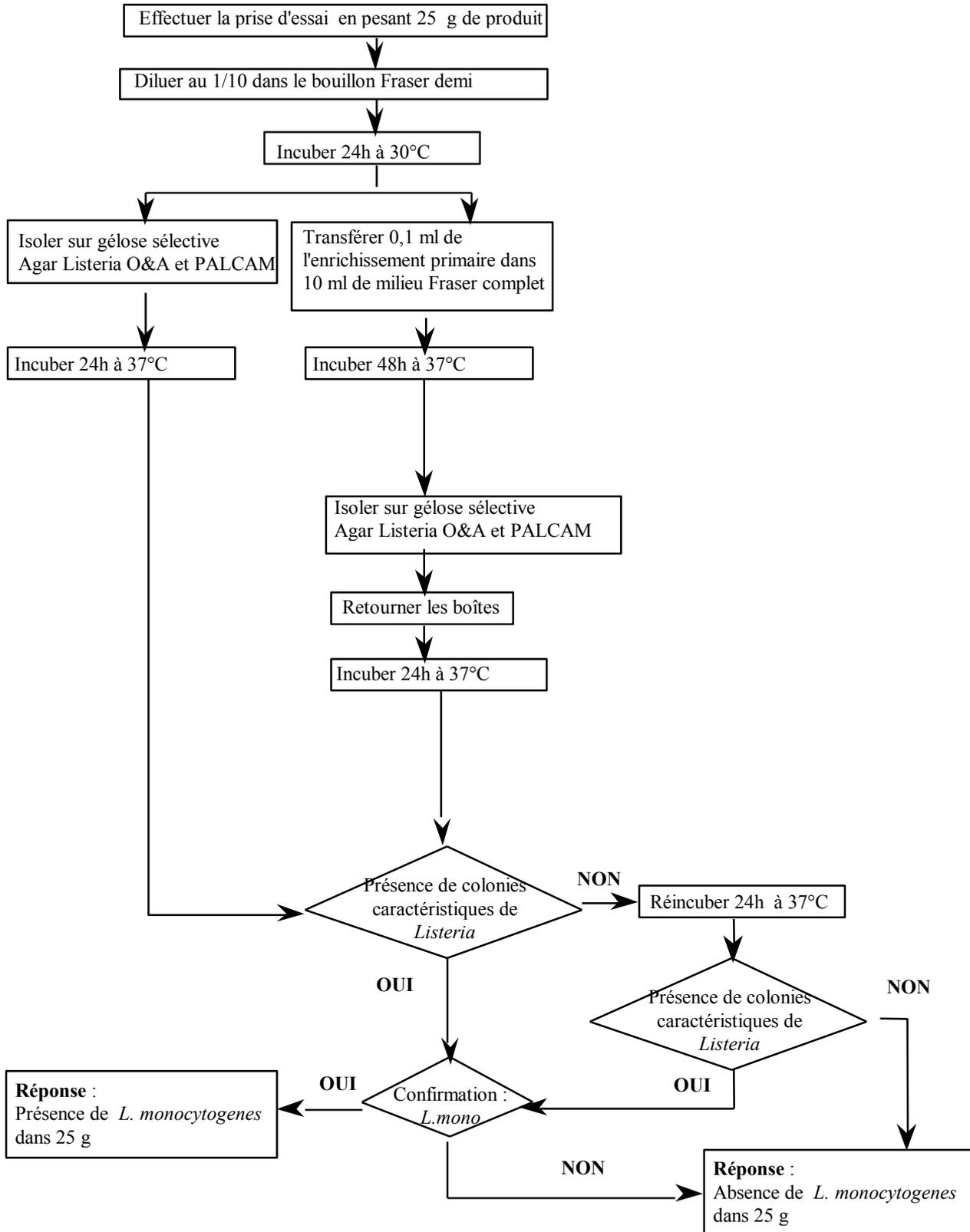
Enfin, les protocoles d'extension développés permettent d'améliorer le protocole actuellement validé : réduction des temps d'incubation, simplification du protocole d'extraction, le cas échéant.

ANNEXES

ANNEXE A :

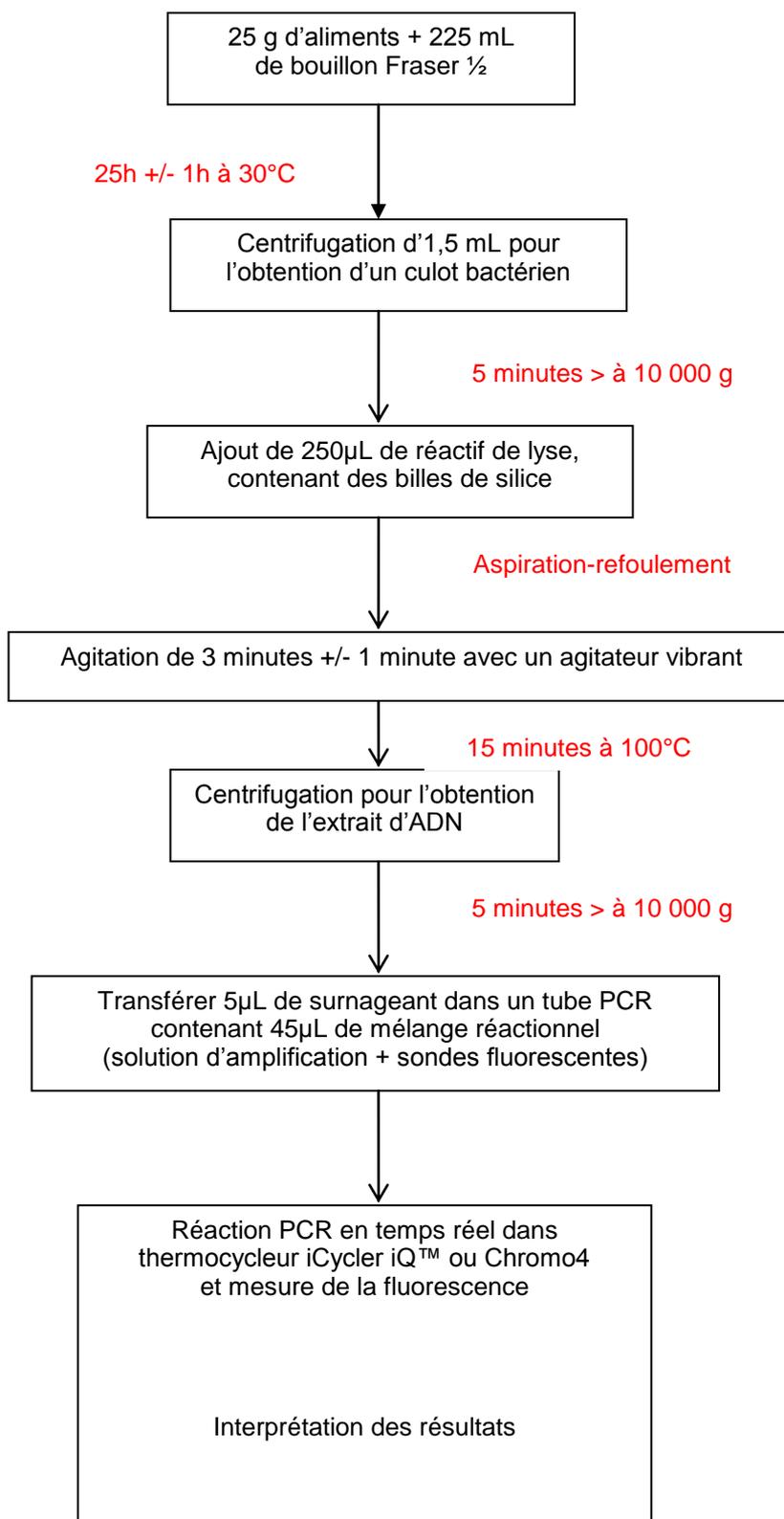
PROTOCOLES ANALYTIQUES

NORME ISO 11290-1 : 2004

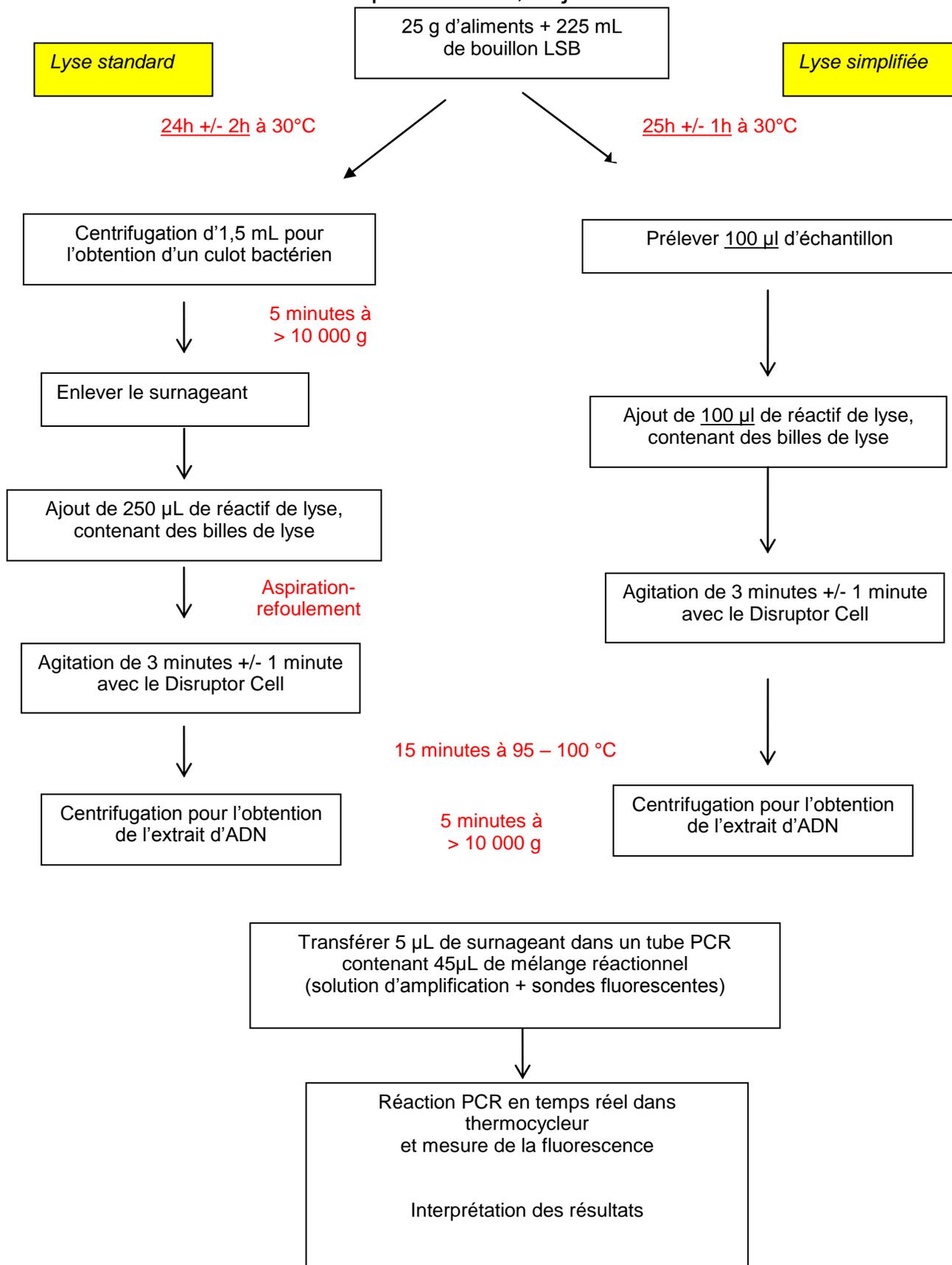


METHODE iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* (BIO-RAD)

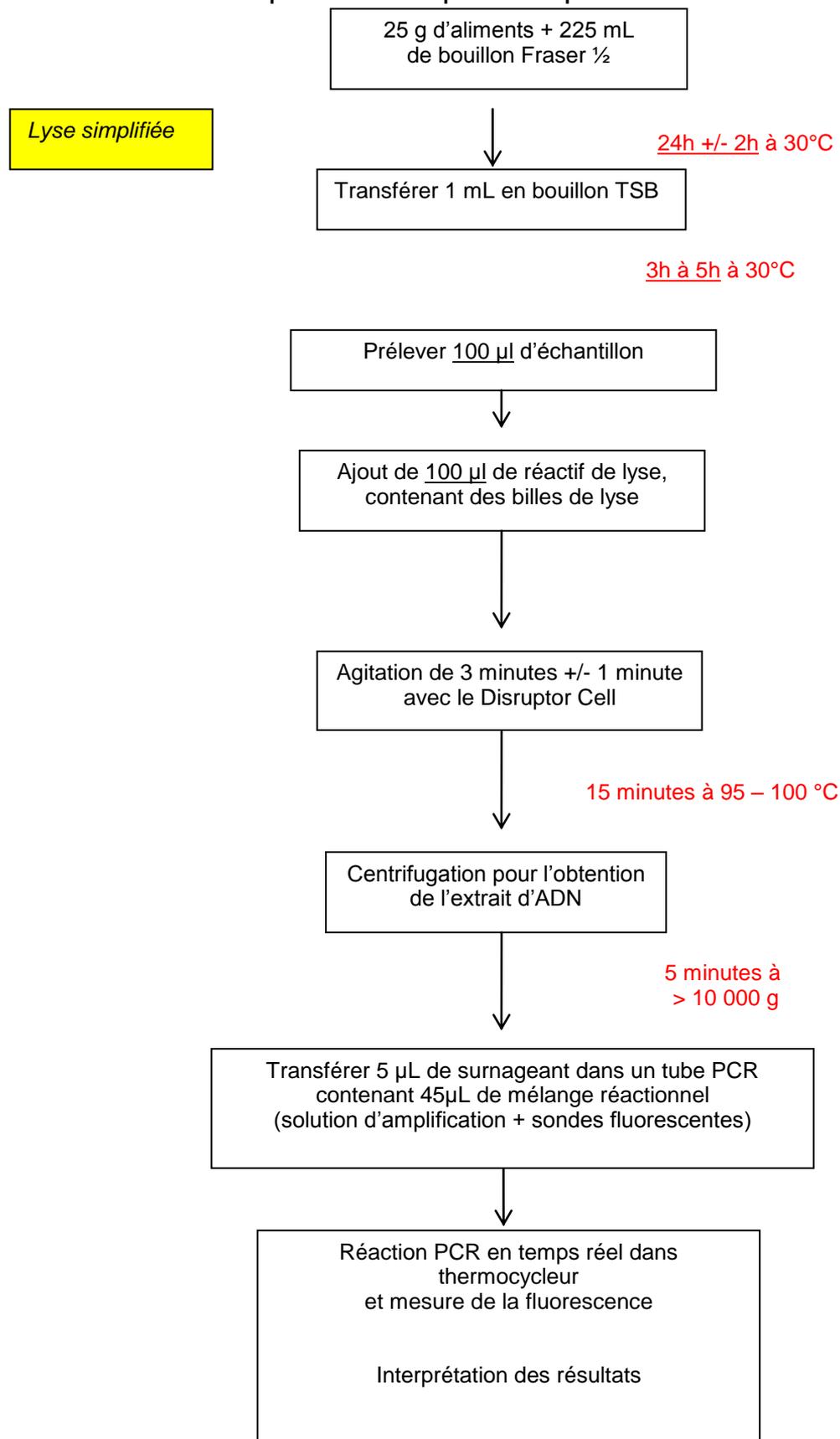
Protocole initialement validé



METHODE iQ-Check™ *Listeria monocytogenes*.
Protocole complémentaire, objet de l'étude d'extension



METHODE iQ-Check™ *Listeria monocytogenes*.
Protocole complémentaire pour les prélèvements d'environnement



ANNEXE B :

ETUDE DE COMPARAISON DES METHODES
-
SYNTHESE DES RESULTATS PAR CATEGORIE
ETUDE 2005 : protocole Fraser ½

TABLEAUX DE RESULTATS PAR CATEGORIE D'ECHANTILLONS

Réponses produits carnés (76)	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 29	Déviati on positive (R-/A+) PD = 1
Méthode alternative négative (A-)	Déviati on négative (A-/R+) ND = 1	Accord négatif (A-/R-) NA = 45

Réponses produits laitiers (66)	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 30	Déviati on positive (R-/A+) PD = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviati on négative (A-/R+) ND = 0	Accord négatif (A-/R-) NA = 36

Réponses produits de la pêche (63)	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 29	Déviati on positive (R-/A+) PD = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviati on négative (A-/R+) ND = 3	Accord négatif (A-/R-) NA = 31

Réponses produits végétaux (61)	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 30	Déviati on positive (R-/A+) PD = 1
Méthode alternative négative (A-)	Déviati on négative (A-/R+) ND = 0	Accord négatif (A-/R-) NA = 30

Réponses environnement (77)	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 37	Déviati on positive (R-/A+) PD = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviati on négative (A-/R+) ND = 0	Accord négatif (A-/R-) NA = 40

ANNEXE C :

ETUDE DE COMPARAISON DES METHODES
-
SYNTHESE DES RESULTATS PAR CATEGORIE
ETUDE 2006 : protocole LSB

TABLEAUX DE RESULTATS PAR CATEGORIE D'ECHANTILLONS

	Protocole lyse standard (LSB 22h)	
	Méthode de référence positive (R+)	Méthode référence négative (R-)
<u>produits carnés</u>		
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 23	Déviati on positive (R-/A+) PD = 11
Méthode alternative négative (A-)	Déviati on négative (A-/R+) ND = 4	Accord négatif (A-/R-) NA = 32 *

* dont 2 résultats positifs non confirmés

** dont 1 résultat positif non confirmé

Protocole lyse simplifié (LSB 24h)	
Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Accord positif (A+/R+) PA = 23	Déviati on positive (R-/A+) PD = 10
Déviati on négative (A-/R+) ND = 4	Accord négatif (A-/R-) NA = 33 **

	Protocole lyse standard (LSB 22h)	
	Méthode de référence positive (R+)	Méthode référence négative (R-)
<u>produits laitiers</u>		
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 31	Déviati on positive (R-/A+) PD = 3
Méthode alternative négative (A-)	Déviati on négative (A-/R+) ND = 2	Accord négatif (A-/R-) NA = 31

Protocole lyse simplifié (LSB 24h)	
Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Accord positif (A+/R+) PA = 29	Déviati on positive (R-/A+) PD = 3
Déviati on négative (A-/R+) ND = 4	Accord négatif (A-/R-) NA = 31

	Protocole lyse standard (LSB 22h)	
	Méthode de référence positive (R+)	Méthode référence négative (R-)
<u>produits de la pêche</u>		
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 30	Déviati on positive (R-/A+) PD = 5
Méthode alternative négative (A-)	Déviati on négative (A-/R+) ND = 1	Accord négatif (A-/R-) NA = 32 *

* dont 1 résultat positif non confirmé

Protocole lyse simplifié (LSB 24h)	
Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Accord positif (A+/R+) PA = 29	Déviati on positive (R-/A+) PD = 5
Déviati on négative (A-/R+) ND = 2	Accord négatif (A-/R-) NA = 32 *

	Protocole lyse standard (LSB 22h)	
	Méthode de référence positive (R+)	Méthode référence négative (R-)
<u>produits végétaux</u>		
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 26	Déviati on positive (R-/A+) PD = 3
Méthode alternative négative (A-)	Déviati on négative (A-/R+) ND = 2	Accord négatif (A-/R-) NA = 31

Protocole lyse simplifié (LSB 24h)	
Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Accord positif (A+/R+) PA = 26	Déviati on positive (R-/A+) PD = 3
Déviati on négative (A-/R+) ND = 2	Accord négatif (A-/R-) NA = 31

	Protocole lyse standard (LSB 22h)	
	Méthode de référence positive (R+)	Méthode référence négative (R-)
<u>prélèvements d'environnement</u>		
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 28	Déviati on positive (R-/A+) PD = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviati on négative (A-/R+) ND = 2 *	Accord négatif (A-/R-) NA = 31 **

* dont 1 résultat positif non confirmé

** dont 4 résultats positifs non confirmés

*** dont 2 résultats positifs non confirmés

Protocole lyse simplifié (LSB 24h)	
Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Accord positif (A+/R+) PA = 28	Déviati on positive (R-/A+) PD = 0
Déviati on négative (A-/R+) ND = 2	Accord négatif (A-/R-) NA = 31 ***

ANNEXE D :

ETUDE D'INCLUSIVITE / EXCLUSIVITE
-
TABLEAUX DE RESULTATS

Inclusivité Fraserdemi - 2005

Référence	Souche	Origine	Taux d'inoculation dans 225 mL de Fraser 1/2	ADN pur		Résultat du test
				Ct C.int	Ct FAM	
A20	<i>Listeria monocytogenes</i>	Fromage au lait cru	6,9	21,4	35,4	Pos
L11	<i>Listeria monocytogenes</i>	Epinard	6,1	25,0	34,8	Pos
L121	<i>Listeria monocytogenes</i>	Fromage	6,5	26,7	35,5	Pos
L123	<i>Listeria monocytogenes</i>	Mozzarella	7,4	27,1	34,6	Pos
L124	<i>Listeria monocytogenes</i>	Filet de perche	7,4	27,8	34,0	Pos
L125	<i>Listeria monocytogenes</i>	Légumes poêlés	10,9	28,6	33,9	Pos
L130	<i>Listeria monocytogenes</i>	Viande hachée	6,9	25,6	34,3	Pos
L20	<i>Listeria monocytogenes</i>	Brisures de saumon	7,1	27,5	35,5	Pos
L25	<i>Listeria monocytogenes</i>	Poule	8,8	29,0	34,6	Pos
L69	<i>Listeria monocytogenes</i>	Saucisson	8,8	26,7	33,8	Pos
L70	<i>Listeria monocytogenes</i>	Saumon fumé	5,9	25,7	34,5	Pos
L7	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Munster	10,8	28,1	34,8	Pos
L10	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Rillettes	7,6	28,1	35,0	Pos
L116	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Coquille de poisson	5,4	22,1	34,6	Pos
L119	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Munster	13,3	28,4	33,6	Pos
L12	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Saumon fumé	7,1	30,6	34,5	Pos
L129	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Pommes rissolées	5,1	29,3	34,5	Pos
L4	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	ATTCC 35152	8,3	27,0	33,9	Pos
L40	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Munster	6,9	27,0	35,9	Pos
L42	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Escalope de poulet	9,5	29,0	34,4	Pos
L43	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Viande hachée	6,3	27,7	33,8	Pos
L44	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Saucisson	5,7	27,9	33,6	Pos
L45	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Terrine de lapin	6,1	25,9	34,1	Pos
L47	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Pommms rissolées	5,2	30,4	34,6	Pos
L5	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Lardons de saumon fumé	5,5	25,9	35,6	Pos
L6	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Pizza	5,4	30,7	34,5	Pos
L13	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	Oreille de porc	4,9	24,8	34,4	Pos
L37	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	Maroilles au lait cru	6,0	22,9	35,4	Pos
L48	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	Langue de porc	7,6	32,1	34,3	Pos
L49	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	Crème de foie de volaille	4,3	32,5	34,6	Pos
L51	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	Fromage affiné	3,9	33,5	34,6	Pos
L52	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	SLCC 2755	2,7	33,4	33,7	Pos
L117	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Saucisse de Montbéliard	5,0	21,9	34,0	Pos
L14	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Viande hachée	4,9	33,2	33,8	Pos
L15	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Bœuf	6,8	25,5	34,6	Pos
L17	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Poitrine de porc	9,2	29,5	34,5	Pos
L18	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Munster	2,7	30,8	34,1	Pos
L53	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Steak haché	4,4	30,7	33,9	Pos
L54	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Bœuf bourguignon	8,4	29,4	34,4	Pos
L55	<i>Listeria monocytogenes</i> 3b	SLCC 2540	8,7	30,7	33,0	Pos
L56	<i>Listeria monocytogenes</i> 3c	SLCC 2479	9,1	26,4	33,9	Pos
L57	<i>Listeria monocytogenes</i> 4a	ATCC 19114	5,4	42,3	33,5	Pos
L32	<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	Munster	7,1	25,6	34,3	Pos
L33	<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	ATCC 19115	4,3	29,3	34,4	Pos
L58	<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	Salade	6,1	27,1	34,6	Pos
L60	<i>Listeria monocytogenes</i> 4d	ATCC	7,8	30,7	33,6	Pos
L61	<i>Listeria monocytogenes</i> 4e	ATCC 19118	7,3	31,8	34,1	Pos
L62	<i>Listeria monocytogenes</i> 4e	Reblochon	7,4	28,2	34,3	Pos
L63	<i>Listeria monocytogenes</i> 4e	Munster	7,0	27,3	34,9	Pos
L67	<i>Listeria monocytogenes</i> 7	SLCC 2482	8,3	30,4	33,5	Pos

Référence	Souche	Origine	Taux d'inoculation dans 225 mL de bouillon LSB ou Fraser 1/2	Lyse simplifiée après bouillon LSB			Lyse simplifiée après bouillon Fraser 1/2 puis TSB		
				Ct C.int	Ct FAM	Résultat	Ct C.int	Ct FAM	Résultat
L5	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Lardons saumon fumé	13,0	24.73	23.75	+	25.46	29.75	+
L6	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Pizza	12,0	24.24	22.64	+	25.95	29.52	+
L7	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Munster croûte	13,0	25.10	26.62	+	25.84	30.07	+
L9	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Munster croûte	7,0	25.05	26.18	+	25.50	33.07	+
L10	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Rillettes	9,0	24.56	24.24	+	25.48	30.59	+
L11	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Munster croûte	12,0	24.38	22.97	+	25.25	27.88	+
L12	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Saumon fumé	11,0	25.09	26.23	+	26.22	31.69	+
L13	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	Oreille de porc	7,0	25.90	34.33	+	25.81	29.15	+
L14	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Steak haché	12,0	24.03	20.86	+	26.45	29.74	+
L15	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Bœuf MP	9,0	24.26	22.69	+	25.21	29.34	+
L16	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Viande hachée	7,0	23.13	17.00	+	25.57	23.57	+
L17	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Poitrine	6,0	24.05	19.17	+	25.40	25.20	+
L18	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Munster croûte	6,0	23.94	19.79	+	25.44	24.49	+
L20	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	Brisures de saumon fumé	5,0	24.70	22.72	+	25.97	25.69	+
L25	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	Poule	10,0	24.68	21.80	+	26.00	28.22	+
L28	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Eponge de surface	6,0	24.82	20.86	+	26.25	26.17	+
L32	<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	Munster	10,0	23.53	17.14	+	26.10	25.23	+
L37	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	Maroille lait cru	8,0	23.10	17.38	+	26.00	24.48	+
L39	<i>Listeria monocytogenes</i>	Saucisson sec jambon	6,0	23.91	17.99	+	26.10	27.66	+
L40	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Munster fermier	9,0	24.06	19.18	+	26.07	26.82	+
L42	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Escalope de poulet	6,0	24.32	22.49	+	25.60	25.97	+
L43	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Steak haché	6,6	24.68	23.47	+	26.21	27.04	+
L44	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Saucisson	5,0	24.83	24.02	+	26.63	25.67	+
L45	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Terrine de lapin noisette	6,0	25.35	24.70	+	26.74	27.29	+
L47	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Pommes rissolées	6,0	25.22	24.59	+	26.53	28.91	+
L48	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	Langue de porc	5,4	24.26	23.19	+	26.15	28.35	+
L49	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	Crème foie de volaille	8,0	24.59	24.21	+	25.92	26.35	+
L51	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	Germain affiné	5,5	24.75	24.40	+	25.99	27.70	+
L53	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Steak haché	6,6	24.54	23.23	+	26.01	26.53	+
L54	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Bœuf bourguignon	5,0	25.06	26.10	+	25.98	28.52	+
L55	<i>Listeria monocytogenes</i> 3b	SLCC 2540	7,0	25.17	29.90	+	26.54	32.29	+
L56	<i>Listeria monocytogenes</i> 3c	SLCC 2479	6,6	25.63	27.12	+	27.11	28.77	+
L58	<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	Salade	10,0	24.98	23.83	+	25.98	26.85	+
L62	<i>Listeria monocytogenes</i> 4e	Reblochon	7,2	24.33	22.90	+	26.37	26.66	+
L63	<i>Listeria monocytogenes</i> 4e	Munster	6,5	23.67	20.15	+	24.53	25.40	+
L116	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Coquille de poisson	4,5	24.28	20.08	+	24.90	25.13	+
L117	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Saucisse de Montbéliard	5,5	24.74	20.76	+	25.38	26.01	+
L119	<i>Listeria monocytogenes</i>	Epinard	6,5	23.50	19.79	+	24.93	24.87	+
L121	<i>Listeria monocytogenes</i>	Fromage de Neufchâtel	6,0	23.98	20.07	+	26.05	25.30	+
L123	<i>Listeria monocytogenes</i>	Mozzarella	5,5	24.31	20.64	+	25.13	25.35	+
L124	<i>Listeria monocytogenes</i>	Filet de perche	5,5	24.05	20.25	+	25.89	25.52	+
L128	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Tourteaux de soja	4,5	23.99	20.01	+	26.14	25.38	+
L129	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Pommes rissolées	7,0	24.74	20.80	+	25.27	26.32	+
L130	<i>Listeria monocytogenes</i>	Steak haché	6,0	24.12	20.43	+	24.66	25.87	+
L137	<i>Listeria monocytogenes</i>	Coulommier lait cru	6,0	25.02	23.61	+	24.73	26.64	+
L141	<i>Listeria monocytogenes</i>	Prélèvement environnement	6,0	24.43	22.62	+	24.19	27.55	+
L149	<i>Listeria monocytogenes</i>	Prélèvement environnement	5,0	24.07	20.91	+	24.52	25.77	+
L152	<i>Listeria monocytogenes</i>	Prélèvement environnement	6,5	24.19	20.75	+	23.78	26.29	+
L156	<i>Listeria monocytogenes</i>	Pommes frites	6,0	24.03	20.05	+	23.25	23.57	+
L176	<i>Listeria monocytogenes</i>	Entrecôte de bœuf	4,5	24.40	21.22	+	26.39	25.75	+

Référence	Souche	Origine	Taux d'inoculation dans 225 mL de Fraser 1/2	ADN pur		Résultat du test
				Ct Cint	Ct FAM	
L64	<i>Listeria innocua</i>	Epoisses	6,70E+04	N/A	33,5	Neg
L72	<i>Listeria innocua</i>	Boulette d'Avesnes	6,70E+04	N/A	33,0	Neg
L78	<i>Listeria innocua</i>	Coquelet	3,40E+04	N/A	31,6	Neg
L77	<i>Listeria innocua 6a</i>	Saucisse de Toulouse	6,80E+04	N/A	33,3	Neg
L76	<i>Listeria innocua 6b</i>	Steak haché	1,80E+04	N/A	33,4	Neg
L80	<i>Listeria ivanovii</i>	Collection	2,60E+04	N/A	33,2	Neg
L151	<i>Listeria ivanovii</i>	Pavé de bœuf haché	6,20E+04	N/A	33,2	Neg
L133	<i>Listeria ivanovii</i>	Roquefort	7,90E+04	N/A	33,2	Neg
L146	<i>Listeria grayi</i>	Collection	3,60E+04	N/A	33,7	Neg
L143	<i>Listeria grayi</i>	Frites surgélées	2,20E+04	N/A	33,7	Neg
L142	<i>Listeria seeligeri</i>	Fromage au lait cru	5,90E+04	N/A	34,3	Neg
L84	<i>Listeria seeligeri</i>	Steak haché	7,80E+04	N/A	34,4	Neg
L91	<i>Listeria welshimeri</i>	Rosette	1,25E+05	N/A	34,9	Neg
L99	<i>Listeria welshimeri</i>	Saucisses	1,02E+05	N/A	34,8	Neg
L87	<i>Listeria welshimeri</i>	Steak haché	7,70E+04	N/A	33,9	Neg
L83	<i>Listeria seeligeri</i>	Langue de porc en gelée	7,50E+05	N/A	33,7	Neg

Référence	Souche	Origine	Taux d'inoculation dans 225 mL de bouillon nutritif non sélectif (UFC)	ADN pur		Résultat du test	Isolement sur gélose TSAYE	Taux d'inoculation dans 225 mL de bouillon Fraser 1/2 (UFC)	ADN pur		Résultat du test	Isolement sur gélose TSAYE
				Ct Cint	Ct FAM				Ct TEX	Ct FAM		
BA1	<i>Bacillus cereus</i>	Ovoproduit	9,00E+04	N/A	31,2	Neg	+					
BA5	<i>Bacillus sphaericus</i>	Produit carné	2,00E+02	N/A	33,8	Neg	+					
BA4	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Produit laitier	1,10E+05	N/A	31,2	Neg	+					
15	<i>Brochothrix</i>	Viande hachée	4,80E+04	N/A	33,8	Neg	+					
Le3	<i>Candida albicans</i>	Collection	7,30E+04	N/A	31,4	Neg	+					
26	<i>Corynebacterie aquaticum</i>	Fromage au lait cru	6,70E+04	N/A	31,0	Neg	+					
3	<i>Corynebacterie spp.</i>	Collection	1,60E+05	N/A	31,9	Neg	+					
E1	<i>Enterococcus faecalis</i>	Ovoproduit	7,30E+04	N/A	34,0	Neg	+					
E6	<i>Enterococcus faecalis</i>	Collection ATCC 19433	2,40E+05	N/A	31,2	Neg	+					
E2	<i>Enterococcus faecium</i>	Collection ATCC 3286	2,50E+05	37,6	31,5	Pos	+	4,60E+04	N/A	34,5	Neg	+
			1,40E+05	38,8	33,7	Pos	+					
E7	<i>Enterococcus faecium</i>	Collection CIP 5433	2,60E+05	N/A	31,3	Neg	+					
L139	<i>Jonesia denitrificans</i>	Collection	3,20E+05	N/A	33,6	Neg	+					
22	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Produit laitier	2,00E+05	N/A	31,4	Neg	+					
M3	<i>Micrococcus spp.</i>	Environnement	6,80E+04	N/A	33,9	Neg	+					
32	<i>Rhodococcus equi</i>	Produit carné	3,80E+04	N/A	33,7	Neg	+					
Le5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Extrait de café	1,10E+05	N/A	33,9	Neg	+					
ST17	<i>Staphylococcus aureus</i>	Yaourt	2,20E+04	N/A	33,8	Neg	+					

Référence	Souche	Origine	Taux dans 10mL de bouillon nutritif non sélectif (UFC/mL)	Protocole de lyse simplifié		
				Ct C.int	Ct FAM	Résultat
L1	<i>Listeria grayi</i>	Frites surgelées	1,0E+05	25.75	N/A	-
L140	<i>Listeria grayi</i>	ATCC 19120	1,0E+05	25.71	N/A	-
L142	<i>Listeria innocua</i>	Gorgonzola	1,0E+05	25.87	N/A	-
L146	<i>Listeria innocua</i>	Flétan fumé	1,0E+06	25.23	N/A	-
L147	<i>Listeria innocua</i>	Epoisses	3,0E+05	24.92	N/A	-
L154	<i>Listeria innocua</i>	Epoisses	4,5E+05	25.79	N/A	-
L155	<i>Listeria innocua</i>	Epinard	4,0E+05	25.88	N/A	-
L157	<i>Listeria innocua</i>	Boulettes d'Avesnes	4,0E+05	25.85	N/A	-
L158	<i>Listeria innocua</i>	Coquelet	3,5E+05	25.96	N/A	-
L159	<i>Listeria innocua</i> 6a	Saucisse de Toulouse	4,0E+05	25.44	N/A	-
L173	<i>Listeria innocua</i> 6b	Steak haché	4,5E+05	26.39	N/A	-
L175	<i>Listeria innocua</i> 6a	ATCC 33090	1,5E+05	26.26	N/A	-
L180	<i>Listeria ivanovii</i>	Steak haché	4,5E+05	25.98	N/A	-
L182	<i>Listeria ivanovii</i>	Prélèvement environnement	1,2E+05	25.71	N/A	-
L3	<i>Listeria ivanovii</i>	Collection	3,7E+05	25.05	N/A	-
L82	<i>Listeria ivanovii</i>	Filet anti-oiseaux	1,5E+05	26.55	N/A	-
(C11)	<i>Listeria ivanovii</i>	Résidus d'environnement	1,0E+06	30.27	N/A	-
L85	<i>Listeria seeligeri</i>	Eau d'égoût	1,0E+05	24.98	N/A	-
L86	<i>Listeria seeligeri</i>	Steak haché	1,4E+05	25.51	N/A	-
L87	<i>Listeria seeligeri</i> 1/2b	Langue	3,0E+05	25.20	N/A	-
L90	<i>Listeria welshimeri</i>	Pâte à tartiner	1,0E+05	25.52	N/A	-
L91	<i>Listeria welshimeri</i>	Jambon à l'ancienne	1,0E+05	25.40	N/A	-
BA2	<i>Bacillus cereus</i>	Betteraves	3,0E+05	25.70	N/A	-
BA4	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Produit laitier	3,0E+05	24.72	N/A	-
BA5	<i>Bacillus sphaericus</i>	Produit carné	2,0E+05	25.37	N/A	-
BA7	<i>Bacillus coagulans</i>	Collection	5,0E+05	25.49	N/A	-
E1	<i>Enterococcus faecalis</i>	Ovoproduit	3,0E+05	25.97	N/A	-
E2	<i>Enterococcus faecium</i>	Collection ATCC 3286	3,0E+05	26.30	N/A	-
E3	<i>Streptococcus bovis</i>	Collection	2,3E+05	25.24	N/A	-
E6	<i>Enterococcus faecalis</i>	Collection ATCC 19433	4,0E+05	26.40	N/A	-
E7	<i>Enterococcus faecium</i>	Collection CIP 5433	6,7E+05	25.47	N/A	-
33	<i>Lactobacillus casei</i>	Produit laitier	2,3E+05	25.63	N/A	-
L139	<i>Jonesia denitrificans</i>	Collection	1,6E+05	25.62	N/A	-
Le1	<i>Rhodotorula rubra</i>	Pâtisserie	2,0E+05	25.66	N/A	-
Le3	<i>Candida albicans</i>	Collection	9,0E+05	25.22	N/A	-
ST3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Yaourt	4,8E+05	25.35	N/A	-

INCLUSIVITE

Souche	Référence IPL	Origine	Taux d'inoculation dans 225 mL de bouillon LSB	iQ-check <i>Listeria monocytogenes</i>			
				Analyse manuelle			Analyse automatique Résultat
				Ct cible	Ct CI	résultat	
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	L4	ATCC 35152	7,0	26,06	34,07	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	L5	Lardons saumon fumé	3,0	26,28	35,11	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	L6	Pizza	6,0	25,07	34,51	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	L7	Munster croûte	7,0	24,69	34,29	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	L9	Munster croûte	8,0	27,57	35,24	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	L10	Rillettes	10,0	24,41	34,93	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	L11	Munster croûte	12,0	24,58	34,99	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	L12	Saumon fumé	12,0	25,24	34,4	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	L13	Oreille de porc	9,0	27,59	35,52	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	L14	Steak haché	8,0	28,17	34,94	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	L15	Bœuf MP	12,0	24,42	35,42	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	L16	Viande hachée	8,0	24,6	34,13	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	L17	Poitrine	7,0	29,88	35,07	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	L18	Munster croûte	7,0	26,34	34,71	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	L20	Brisures de saumon fumé	15,0	26,07	35,67	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	L25	Poule	4,0	29,11	34,6	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	L28	Eponge de surface	12,0	24,43	35,19	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	L32	Munster	5,0	25,28	35,98	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	L 33	ATCC 19115	10,0	24,07	34,34	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	L37	Maroille lait cru	8,0	24,55	34,42	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	L39	Saucisson sec jambon	10,0	25,28	35,3	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	L40	Munster fermier	8,0	28,84	34,95	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	L42	Escalope de poulet	6,0	25,36	34,98	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	L43	Steak haché	8,0	24,47	34,34	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	L44	Saucisson	7,0	23,29	35,83	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	L45	Terrine de lapin noisette	4,0	25,31	34,63	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	L47	Pommes rissolées	15,0	26,01	35,26	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	L48	Langue de porc	3,0	23,04	34,26	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	L49	Crème foie de volaille	9,0	25,03	34,32	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	L51	Germain affiné	15,0	22,97	35,57	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> ½ b	L52	SLCC 2755	5,0	30,4	35,25	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	L53	Steak haché	8,0	22,49	34,23	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	L54	Bœuf bourguignon	8,0	26,91	36,27	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 3b	L55	SLCC 2540	8,0	30,43	35,52	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 3c	L56	SLCC 2479	5,0	28,23	34,49	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 4a	L57	ATCC 19114	3,0	31,32	35,9	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	L58	Salade	10,0	26,12	34,52	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 4 d	L60	ATCC 19117	7,0	16,78	34,87	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 4e	L61	ATCC 19118	4,0	30,76	34,78	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 4e	L62	Reblochon	3,0	24,6	35,49	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 4e	L63	Munster	7,0	24,27	34,73	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 7	L67	SLCC 2482	7,0	28,09	34,25	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	L69	Saucisson	10,0	25,21	36,19	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	L 70	Saumon Irlande	8,0	23,26	35,85	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	L116	Coquille de poisson	10,0	21,1	34,55	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	L117	Saucisse de Montbéliard	8,0	23,02	34,81	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	L119	Epinard	10,0	21,47	35,5	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	L121	Fromage de Neufchâtel	8,0	22,13	34,35	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	L123	Mozzarella	12,0	22,21	35,37	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	L124	Filet de perche	7,0	22,47	35,89	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	L125	Légumes poêlés	6,0	20,95	35,33	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	L128	Tourteaux de soja	9,0	21,03	37,19	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	L129	Pommes rissolées	7,0	24,88	35,69	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	L130	Steak haché	5,0	22,52	35,48	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	L137	Coulommier lait cru	10,0	24,08	36,05	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	L141	Prélèvement environnement	8,0	22,57	35,24	+	+

EXCLUSIVITE

Souche	Référence	Origine	Taux d'inoculation dans 225 mL de bouillon LSB	iQ-check <i>Listeria monocytogenes</i>			
				Analyse manuelle			Analyse automatique Résultat
				Ct cible	Ct CI	résultat	
<i>Listeria innocua</i>	L64	Epoisses	1,0E+05	N/A	35,14	-	-
<i>Listeria innocua</i>	L72	Boulettes d'Avesnes	1,0E+05	N/A	35,47	-	-
<i>Listeria innocua 6b</i>	L76	Steak haché	1,0E+05	N/A	35,29	-	-
<i>Listeria innocua 6a</i>	L77	Saucisse de Toulouse	1,0E+05	N/A	34,72	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>	L80	Collection	1,0E+05	N/A	35,82	-	-
<i>Listeria seeligeri 1/2b</i>	L83	Langue de porc en gelée	1,0E+05	N/A	35,27	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>	L84	Steak haché	1,0E+05	N/A	35,29	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>	L91	Rosette	1,0E+05	N/A	36,04	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>	L100	Pâté à tartiner	1,0E+05	N/A	35,52	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>	L101	Jambon à l'ancienne	1,0E+05	N/A	33,28	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>	L142	Fromage au lait cru	1,0E+05	N/A	33,4	-	-
<i>Listeria innocua</i>	L108	Gorgonzola	1,0E+05	N/A	35,1	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>	L115	Environnement	1,0E+05	N/A	34,88	-	-
<i>Listeria grayi</i>	L146	Collection	1,0E+05	N/A	36,64	-	-
<i>Listeria grayi</i>	L147	ATCC25401	1,0E+05	N/A	35,54	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>	L151	Pavé de bœuf haché	1,0E+05	N/A	35,32	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>	L153	Environnement	1,0E+05	N/A	34,68	-	-
<i>Bacillus sphaericus</i>	BA5	Produit carné	4,0E+05	N/A	34,76	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	BA2	Betteraves	2,0E+05	N/A	34,99	-	-
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	BA4	Produit laitier	2,0E+05	N/A	35,02	-	-
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	15	Viande hachée	2,0E+05	N/A	35,24	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	E1	Ovoproduit	3,0E+05	N/A	35,25	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	E2	Collection ATCC 3286	2,0E+05	N/A	35,11	-	-
<i>Jonesia denitrificans</i>	L139	Collection	5,0E+05	N/A	35,41	-	-
<i>Lactobacillus reuteri</i>	5	Alimentaire	5,0E+05	N/A	35,28	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	52	ATCC9595	1,0E+05	N/A	34,35	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	34	Collection	3,0E+05	N/A	33,47	-	-
<i>Lactobacillus paracasei</i>	35	Collection	1,0E+05	N/A	34,78	-	-
<i>Micrococcus spp.</i>	M1	Environnement	4,0E+04	N/A	35,32	-	-
<i>Rhodococcus equi</i>	32	Produit carné	3,0E+05	N/A	34,39	-	-
<i>Streptococcus bovis</i>	E3	Collection	2,0E+05	N/A	35,2	-	-
<i>Streptococcus bovis</i>	E12	Collection	3,0E+05	N/A	34,31	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ST17	Produit carné	4,0E+05	N/A	35,67	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ST3	Yaourt	4,0E+05	N/A	34,18	-	-

ANNEXE E :

ETUDE INTERLABORATOIRE
-
DEGRE D'ACCORD

METHODE DE REFERENCE**Niveau L0**

Laboratoire	Nb de négatifs attendus	Nb de négatifs obtenus	Probabilité de négatifs	Probabilité de paires de négatifs	Probabilité de positifs	Probabilité de paires de positifs	Probabilité de paires de résultats identiques
Laboratoire A	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire B	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire C	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire D	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire E	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire F	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire G	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire H	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire I	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire J	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire K	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire L	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire M	8	7	0,88	0,77	0,13	0,02	0,78
Laboratoire N	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Moyenne :							0,98
Degré d'accord :							98%

Niveau L1

Laboratoire	Nb de positifs attendus	Nb de positifs obtenus	Probabilité de positifs	Probabilité de paires de positifs	Probabilité de négatifs	Probabilité de paires de négatifs	Probabilité de paires de résultats identiques
Laboratoire A	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire B	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire C	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire D	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire E	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire F	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire G	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire H	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire I	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire J	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire K	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire L	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire M	8	7	0,88	0,77	0,13	0,02	0,78
Laboratoire N	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Moyenne :							0,98
Degré d'accord :							98%

Niveau L2

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

METHODE ALTERNATIVE

Niveau L0

Laboratoire	Nb de negatifs attendus	Nb de negatifs obtenus	Probabilite de negatifs	Probabilite de paires de negatifs	Probabilite de positifs	Probabilite de paires de positifs	Probabilite de paires de résultats identiques
Laboratoire A	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire B	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire C	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire D	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire E	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire F	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire G	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire H	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire I	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire J	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire K	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire L	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire M	8	7	0,88	0,77	0,13	0,02	0,78
Laboratoire N	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Moyenne :							0,98
Degré d'accord :							98%

Niveau L1

Laboratoire	Nb de positifs attendus	Nb de positifs obtenus	Probabilite de positifs	Probabilite de paires de positifs	Probabilite de negatifs	Probabilite de paires de negatifs	Probabilite de paires de résultats identiques
Laboratoire A	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire B	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire C	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire D	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire E	8	7	0,88	0,77	0,13	0,02	0,78
Laboratoire F	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire G	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire H	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire I	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire J	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire K	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire L	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Laboratoire M	8	7	0,88	0,77	0,13	0,02	0,78
Laboratoire N	8	8	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Moyenne :							0,97
Degré d'accord :							97%

Niveau L2

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

ANNEXE F :

ETUDE INTERLABORATOIRE
-
CONCORDANCE

METHODE ALTERNATIVE

Nombre de laboratoires 14

Nombre de négatifs par laboratoire 8

Niveau L0

Laboratoire	Nb de négatifs attendus	Nb de négatifs obtenus	Paires interlaboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires interlaboratoires
Laboratoire A	8	8	824	832
Laboratoire B	8	8	824	832
Laboratoire C	8	8	824	832
Laboratoire D	8	8	824	832
Laboratoire E	8	8	824	832
Laboratoire F	8	8	824	832
Laboratoire G	8	8	824	832
Laboratoire H	8	8	824	832
Laboratoire I	8	8	824	832
Laboratoire J	8	8	824	832
Laboratoire K	8	8	824	832
Laboratoire L	8	8	824	832
Laboratoire M	8	7	728	832
Laboratoire N	8	8	824	832
Total			11440	11648
Concordance	98,21%			

Nombre de laboratoires 14

Nombre de positifs par laboratoire 8

Niveau L1

Laboratoire	Nb de positifs attendus	Nb de positifs obtenus	Paires interlaboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires interlaboratoires
Laboratoire A	8	8	816	832
Laboratoire B	8	8	816	832
Laboratoire C	8	8	816	832
Laboratoire D	8	8	816	832
Laboratoire E	8	7	722	832
Laboratoire F	8	8	816	832
Laboratoire G	8	8	816	832
Laboratoire H	8	8	816	832
Laboratoire I	8	8	816	832
Laboratoire J	8	8	816	832
Laboratoire K	8	8	816	832
Laboratoire L	8	8	816	832
Laboratoire M	8	7	722	832
Laboratoire N	8	8	816	832
Total			11236	11648
Concordance	96,46%			

Nombre de laboratoires 14

Nombre de positifs par laboratoire 8

Niveau L2

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

METHODE DE REFERENCE

Nombre de laboratoires 14

Nombre de négatifs par laboratoire 8

Niveau L0

Laboratoire	Nb de négatifs attendus	Nb de négatifs obtenus	Paires interlaboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires interlaboratoires
Laboratoire A	8	8	824	832
Laboratoire B	8	8	824	832
Laboratoire C	8	8	824	832
Laboratoire D	8	8	824	832
Laboratoire E	8	8	824	832
Laboratoire F	8	8	824	832
Laboratoire G	8	8	824	832
Laboratoire H	8	8	824	832
Laboratoire I	8	8	824	832
Laboratoire J	8	8	824	832
Laboratoire K	8	8	824	832
Laboratoire L	8	8	824	832
Laboratoire M	8	7	728	832
Laboratoire N	8	8	824	832
Total			11440	11648
Concordance	98,21%			

Nombre de laboratoires 14

Nombre de positifs par laboratoire 8

Niveau L1

Laboratoire	Nb de positifs attendus	Nb de positifs obtenus	Paires interlaboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires interlaboratoires
Laboratoire A	8	8	824	832
Laboratoire B	8	8	824	832
Laboratoire C	8	8	824	832
Laboratoire D	8	8	824	832
Laboratoire E	8	8	824	832
Laboratoire F	8	8	824	832
Laboratoire G	8	8	824	832
Laboratoire H	8	8	824	832
Laboratoire I	8	8	824	832
Laboratoire J	8	8	824	832
Laboratoire K	8	8	824	832
Laboratoire L	8	8	824	832
Laboratoire M	8	7	728	832
Laboratoire N	8	8	824	832
Total			11440	11648
Concordance	98,21%			

Nombre de laboratoires 14

Nombre de positifs par laboratoire 8

Niveau L2

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