

BIO-RAD

3 boulevard Raymond Poincaré
92430 MARNES LA COQUETTE

Validation AFNOR des méthodes alternatives d'analyse
Application à la microbiologie alimentaire

Rapport de synthèse

**Reconduction de la validation
de la méthode RAPID'*Staph* pour
le dénombrement des staphylocoques
à coagulase positive**

Ce rapport comprend 30 pages dont 3 annexes.

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

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

Synthèse Reconduction RAPID'*Staph*
Version 0 (17 février 2009)

ADRIA DEVELOPPEMENT

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

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

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

Sommaire

1	RAPPEL SUR LA METHODE ALTERNATIVE	4
1.1	Date de la première validation et date de reconduction	4
1.2	Protocole et principe de la méthode alternative	4
1.2.1	Principe de la méthode	4
1.2.2	Mode opératoire	4
1.3	Méthode de référence à laquelle la méthode alternative a été comparée	5
1.4	Notice à jour, ainsi que toutes les précédentes notices ayant été en vigueur depuis la précédente validation ou reconduction	5
1.5	Principaux résultats obtenus lors de la validation initiale	6
1.5.1	Etude comparative des méthodes	6
1.5.1.1	Etude de linéarité	6
1.5.1.2	Exactitude relative	10
1.5.1.2	Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)	16
1.5.1.3	Sensibilité relative	17
1.5.1.4	Spécificité – Sélectivité	18
1.5.1.5	Praticabilité	19
1.5.2	Etude interlaboratoire	19
1.5.2.2	Préparation	19
1.5.2.3	Analyses	19
1.5.2.4	Résultats	20
1.5.3	Conclusion	22
2	ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	23
<input type="checkbox"/>	Annexe 1 - Exactitude relative : résultats	24
<input type="checkbox"/>	Annexe 2 - Spécificité et sélectivité : résultats	26
<input type="checkbox"/>	Annexe 3 - Liste des laboratoires collaborateurs	30

Avant Propos

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

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

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

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

- **Méthode à valider :** **Méthode RAPID' *Staph* pour le dénombrement de staphylocoques à coagulase positive**

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

- **Méthode de référence[♦] :** Norme NF EN ISO 6888-1 (octobre 1999) : méthode horizontale pour le dénombrement de *Staphylococcus* à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces) - Partie 1 : technique utilisant le milieu gélosé de Baird Parker

- **Etendue de la validation :** Tous produits d'alimentation humaine et animale et échantillons de l'environnement

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

1 RAPPEL SUR LA METHODE ALTERNATIVE

1.1 Date de la première validation et date de reconduction

La méthode Rapid'Staph pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive a été validée le 04.02.2005 (attestation N°BRD – 07/9 – 02/05). La validation expire le 04.02.09

1.2 Protocole et principe de la méthode alternative

1.2.1 Principe de la méthode

La méthode RAPID'Staph est basée sur un dénombrement sur milieu gélosé RAPID'Staph en 24 h, suivi d'un test de confirmation des colonies caractéristiques par :

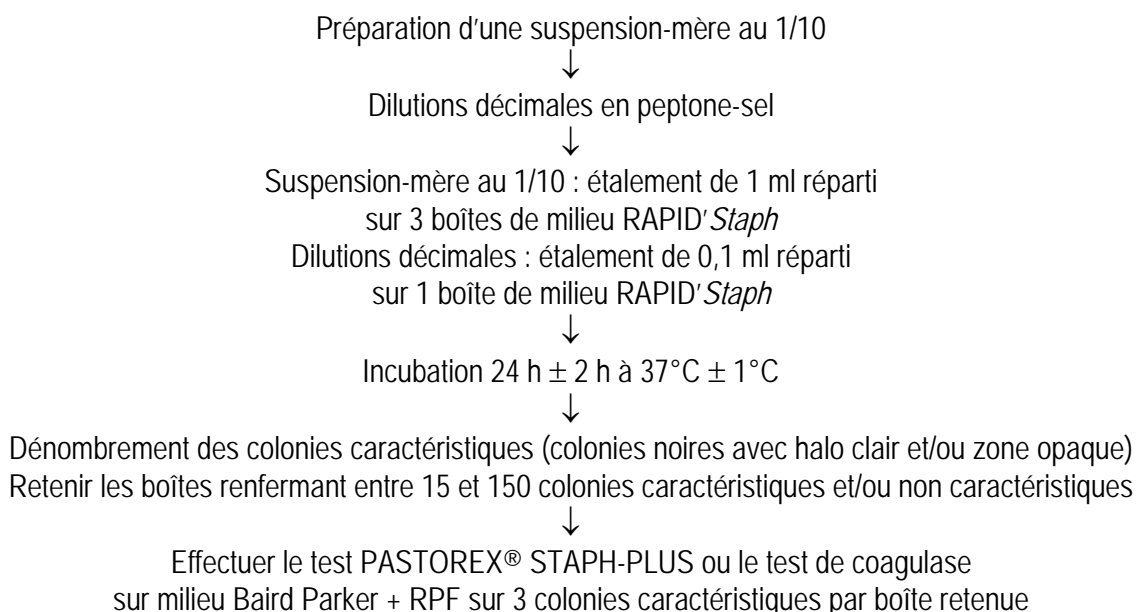
- le test PASTOREX® STAPH-PLUS, test rapide d'agglutination sur lame permettant la détection simultanée du facteur d'affinité pour le fibrinogène de la protéine A et des polysaccharides capsulaires de *Staphylococcus aureus*,

OU

- le test de la coagulase par piqûre sur milieu Baird Parker + RPF. Il est possible de confirmer jusqu'à 12 colonies par boîte.

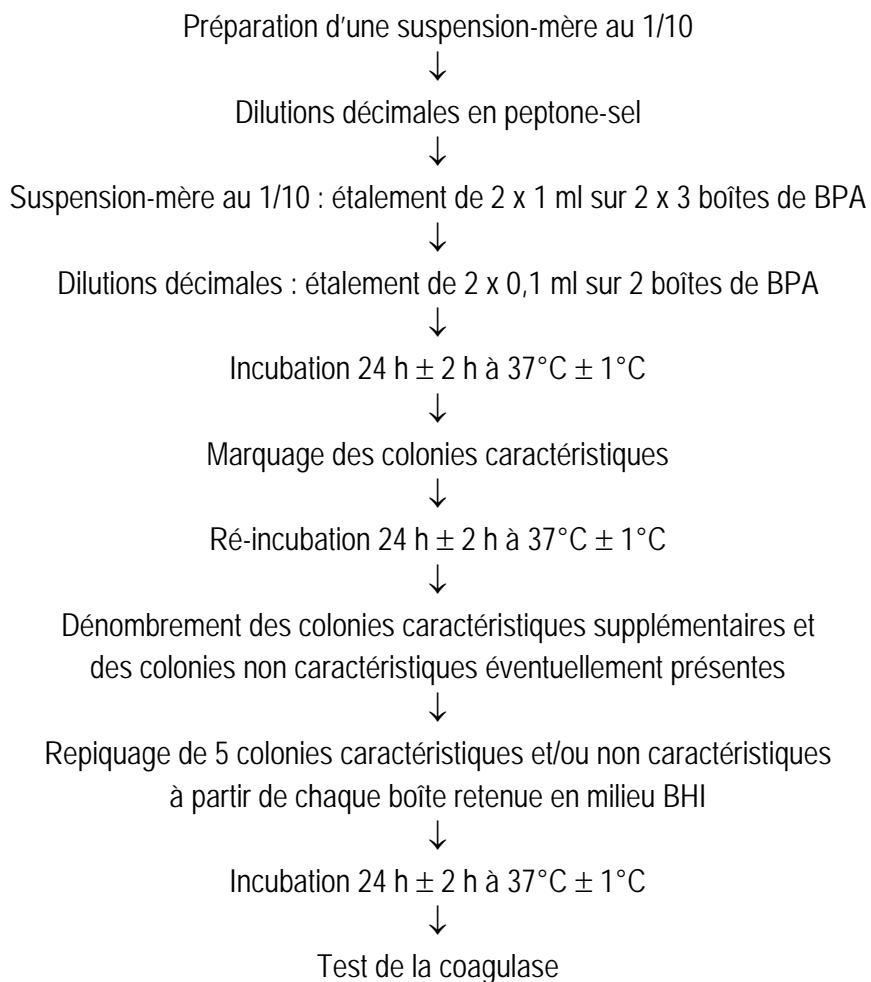
1.2.2 Mode opératoire

Le mode opératoire est présenté ci-après :



1.3 Méthode de référence à laquelle la méthode alternative a été comparée

La méthode de référence utilisée est la méthode NF EN ISO6888 – partie 1



1.4 Notice à jour, ainsi que toutes les précédentes notices ayant été en vigueur depuis la précédente validation ou reconduction

Aucun changement dans la notice depuis la dernière validation.

1.5 Principaux résultats obtenus lors de la validation initiale

1.5.1 Etude comparative des méthodes

1.5.1.1 Etude de linéarité

□ **Matrices utilisées et protocoles de contamination**

Les souches utilisées pour la linéarité ont été stressées avant inoculation dans les matrices afin d'utiliser également ces données dans l'étude d'exactitude.

Les matrices testées, les souches inoculées ainsi que les stress appliquées sont données dans le tableau 1.

Tableau 1 - Evaluation du stress appliqué aux souches de *Staphylococcus aureus*

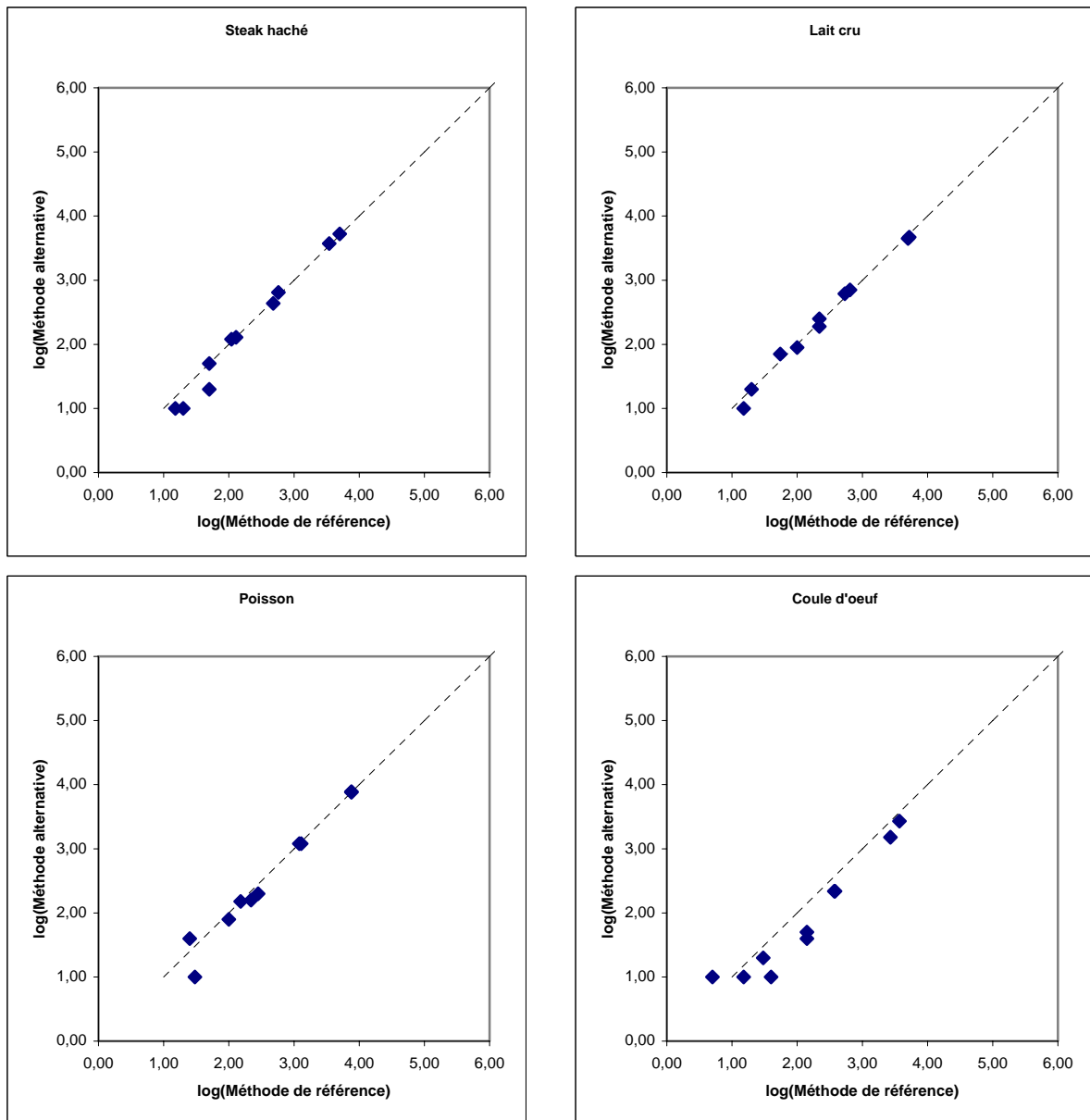
Matrice	Souche	Stress appliqué	$\Delta \log$ (TSYE - Chapman mannité)
Steak haché	<i>S. aureus</i> Ad 160	7 jours à 4°C + 6 jours à -20°C	0,82
Saucisson pour chien	<i>S. aureus</i> Ad 162	14 jours à 4°C en TS + 10 % NaCl	0,66
Lait cru	<i>S. aureus</i> Ad 501	14 jours à 4°C en TS ¹	0,25
Poisson cru congelé	<i>S. aureus</i> Ad 154	7 jours à - 20°C	0,48
Coule d'œuf	<i>S. aureus</i> Ad 159	Traitement thermique 60°C - 2 min	0,72
Eau de rinçage	<i>S. aureus</i> A00M071	4 semaines en TS + 10 % NaCl	0,41

□ **Résultats**

Les graphiques bidimensionnels pour chaque catégorie sont donnés figure 1 et les droites de régression figure 2.

¹ TS : tryptone-sel

Figure 1 - Linéarité : graphiques bidimensionnels



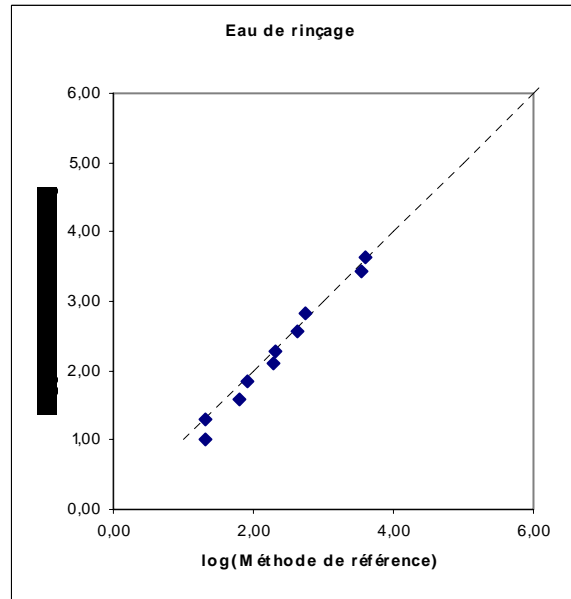
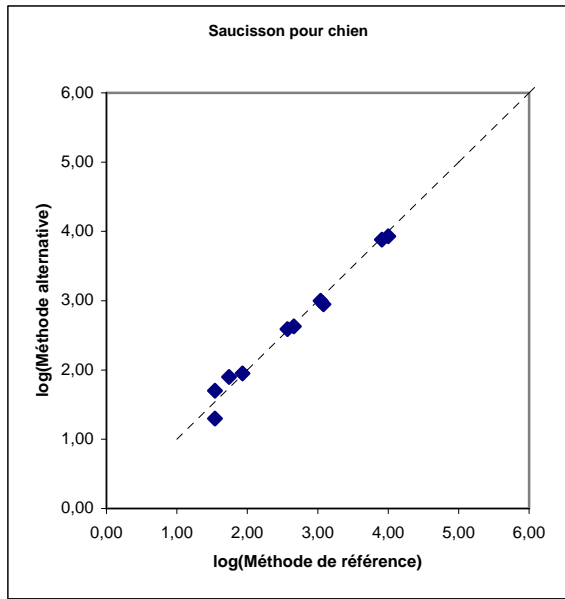
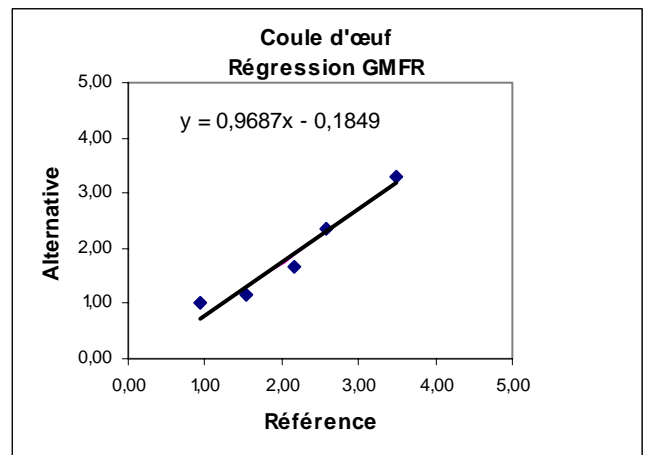
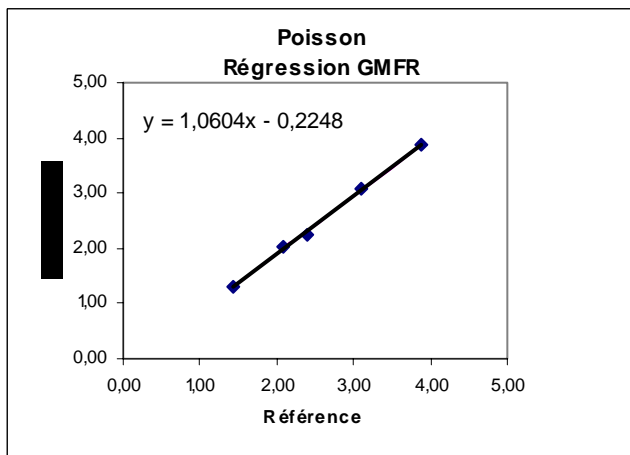
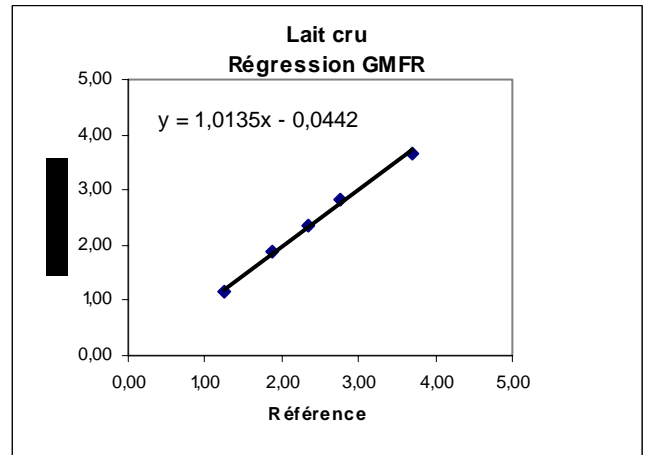
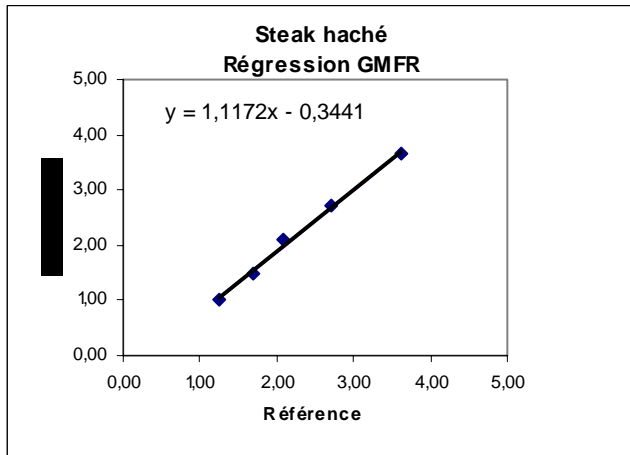
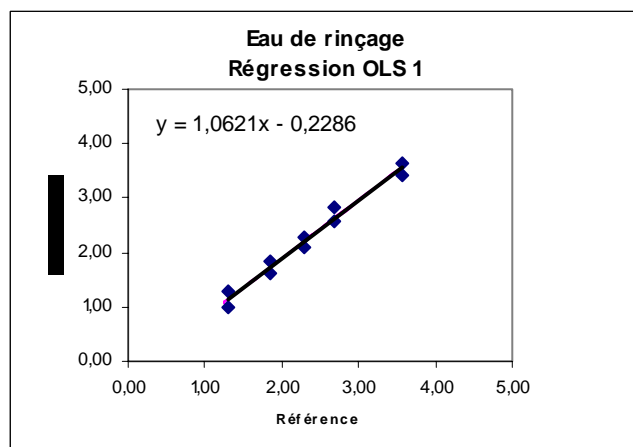
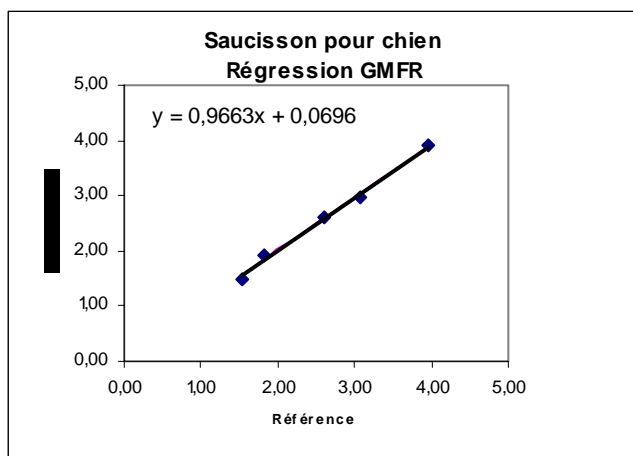


Figure 2 - Linéarité : droites de régression





□ **Interprétations statistiques selon la norme ISO16140**

Tableau 2 - Récapitulatif de l'étude de linéarité

Matrice	Tests statistiques						
	R	Régression utilisée	Rob F.	Valeur critique	Non linéarité P %	Coeff de corrélation	Droite de régression
Steak haché	1,87	GMFR	0,010	5,41	100	0,997	log ALT = 1,117log Réf – 0,344
Lait cru	1,25	GMFR	0,407	5,41	76	0,998	log ALT = 1,014log Réf – 0,044
Poisson cru congelé	1,25	GMFR	0,000	5,41	100	0,999	log ALT = 1,060log Réf – 0,225
Coule d'œuf	0,83	GMFR	26,170	5,41	0,2	0,976	log ALT = 0,969log Réf – 0,185
Saucisson pour chien	0,56	GMFR	6,818	5,41	3	0,998	log ALT = 0,966log Réf + 0,070
Eau de rinçage	3,13	OLS1	0	5,41	100	0,988	log ALT = 1,062log Réf – 0,229

Interprétation statistique :

P > 5 % : pas significatif 1 % < P < 5 % : significatif
 0,1 % < P < 1 % : très significatif P < 0,1 % : hyper significatif

□ **Conclusion**

Les valeurs de P sont supérieures à 5 % pour les matrices suivantes : steak haché, lait cru, poisson cru congelé et eau de rinçage. Le test de non-linéarité apparaît donc non significatif.

Le coefficient de corrélation r de la régression GMFR considérée est égal à 0,99 pour la matrice « saucisson pour chien » ; il est égal à 0,97 pour la matrice « coule d'œuf ». Il est reconnu que le test de non-linéarité « lack of fit » utilisé est non seulement très sévère, mais perd de sa robustesse

lorsque le coefficient de corrélation r est élevé ($> 0,90$). Le test de non-linéarité apparaît significatif au risque de 3 % pour la matrice « saucisson pour chien » et de 0,2 % pour la matrice « coule d'œuf ».

Il est également probable que l'écart de dénombrement, observé pour le taux 10 à 50 UFC/g entre les deux répétitions de la méthode de référence, a également influé sur le résultat du test de non-linéarité pour la matrice « coule d'œuf ».

La méthode RAPID' Staph montre une linéarité relative satisfaisante vis-à-vis de la méthode de référence NF EN ISO 6888-1.

1.5.1.2 Exactitude relative

□ **Nombre et nature des échantillons**

Tableau 3 - Nombre d'échantillons analysés et exploités par catégorie

Catégorie	Nombre d'échantillons analysés	Nombre d'échantillons exploités
Produits carnés	22	5
Produits laitiers	11	5
Produits de la mer	6	5
Divers	8	5
Alimentation animale	7	5
Echantillons de l'environnement	7	5

Des inoculations ont été réalisées, les souches utilisées, les stress appliqués sont donnés tableau 4.

Tableau 4 - Souches utilisées, modes de stress appliqués et évaluation du stress

N° Echantillon	Souche	Origine	Stress appliqué	Δ log (TSYE - Chapman mannité)
509	A00 M071	Thon cuit	Stockage 7 jours en TS + 10 % NaCl	0,36
513	3	Lait cru	Stockage 7 jours en TS pH 10 + dépôt sur boîte et séchage	/
514	Ad 167	Poitrine fumée crue	Stockage 7 jours en TS pH 10 + dépôt sur boîte et séchage	/
515	A00 M071	Thon cuit	Stockage 7 jours en TS pH 10 + dépôt sur boîte et séchage	/
516	Ad 501	Lait cru	3 semaines en TS à 4°C + séchage	/
517	Ad 162	Merguez	3 semaines en TS + 10 % NaCl + séchage	/
544	Ad 162	Merguez	3 semaines en TS + 10 % NaCl + séchage	/
545	Ad 157	Peau de poulet	TS pH 10 7 jours + séchage	/
549	A00 M071	Thon cuit	TS + 10 % NaCl 2 semaines à 4°C	0,49
547	3	Lait cru	TS + 10 % NaCl 2 semaines à 4°C	0,47
548	Ad 153	Lapin	Traitement thermique 60°C - 2 min	> 0,71
552	Ad 605	Lait cru	Traitement thermique 60°C - 2 min	0,83
553	Ad 163	Corail d'écrevisse	Traitement thermique 60°C - 2 min	0,83
554	3	Lait cru	TS + 10 % NaCl 2 semaines à 4°C	0,54
555	Ad 155	VSM de dinde	Traitement thermique 60°C - 2 min	0,54

Au total, 61 échantillons ont été analysés pour obtenir 30 résultats exploitables. Ces derniers ont été cumulés aux résultats de l'étude de linéarité pour aboutir à 60 résultats exploitables.

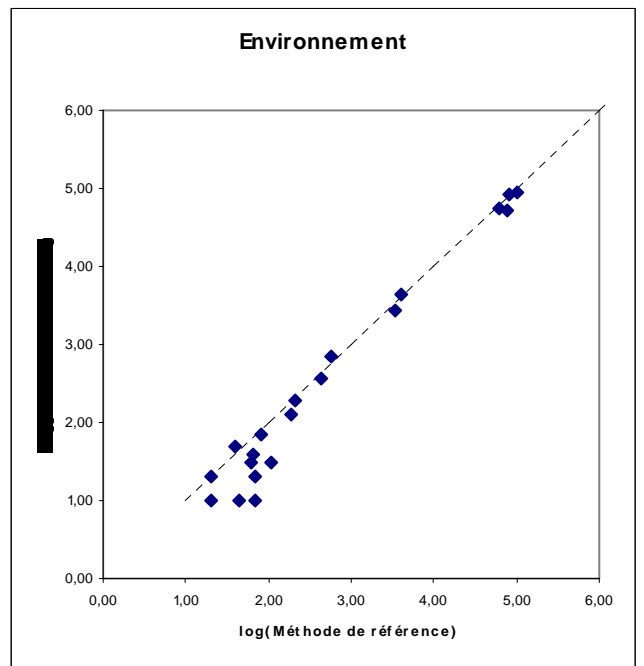
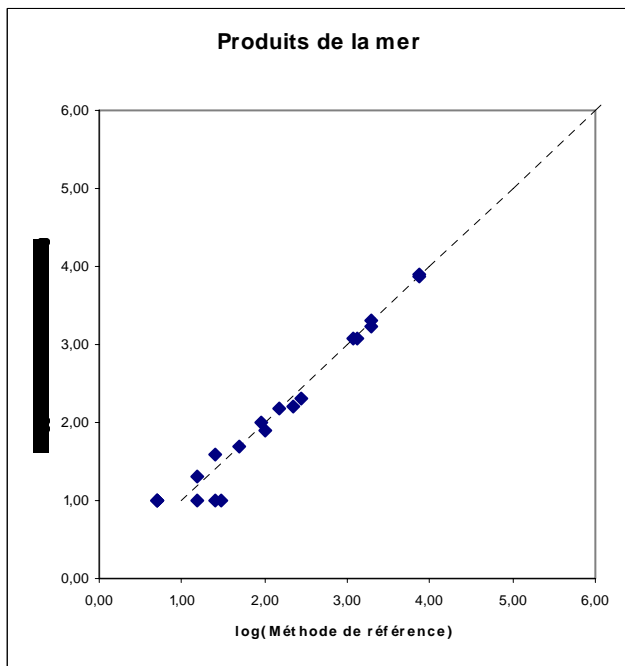
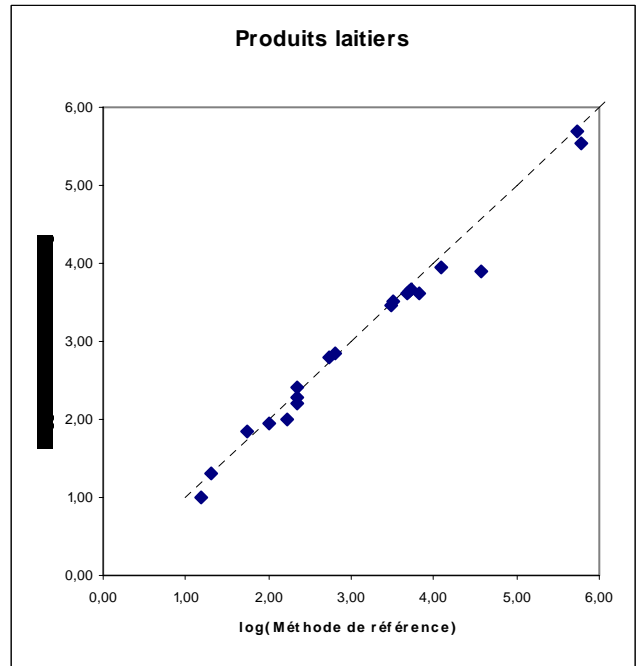
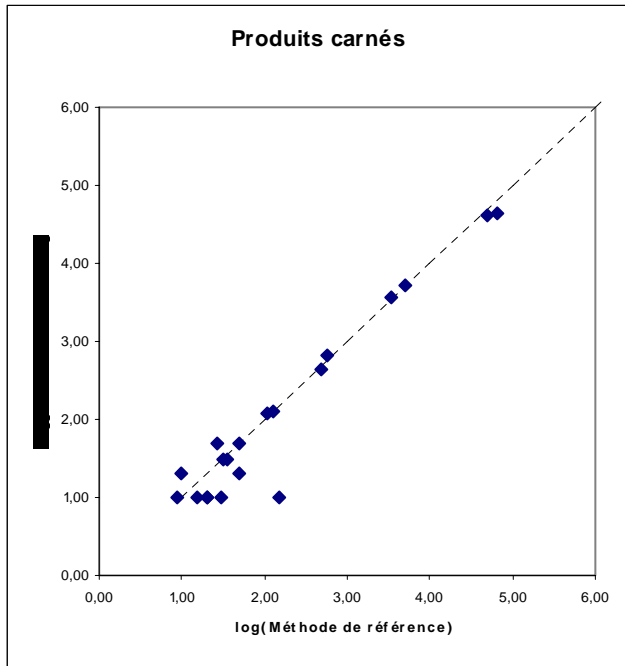
□ **Résultats**

Les résultats bruts sont donnés en annexe 1.

Catégorie d'aliments	Domaine de contamination (log)
Produits carnés	0,95 à 4,70
Produits laitiers	1,00 à 5,78
Produits de la mer	0,70 à 3,89
Divers	0,70 à 4,08
Alimentation animale	1,00 à 4,00
Environnement	1,00 à 5,00

Les graphiques bidimensionnels pour chaque catégorie sont donnés figure 3 et les droites de régression figure 4.

Figure 3 - Exactitude relative : graphiques bidimensionnels



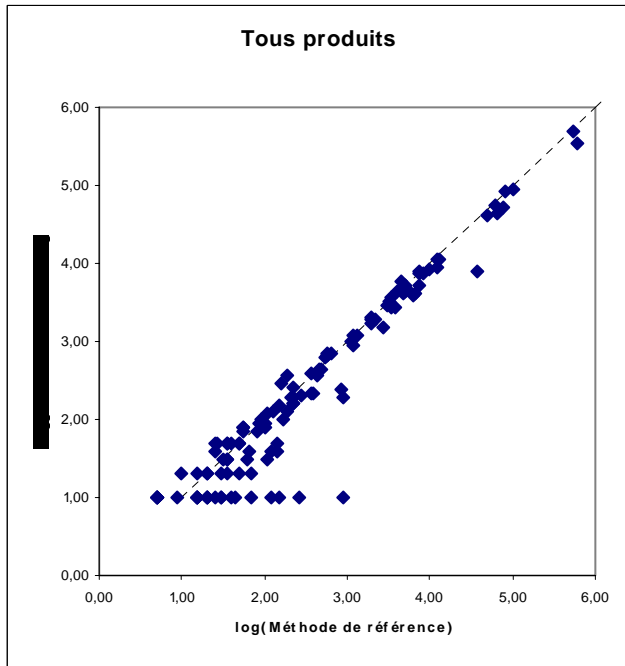
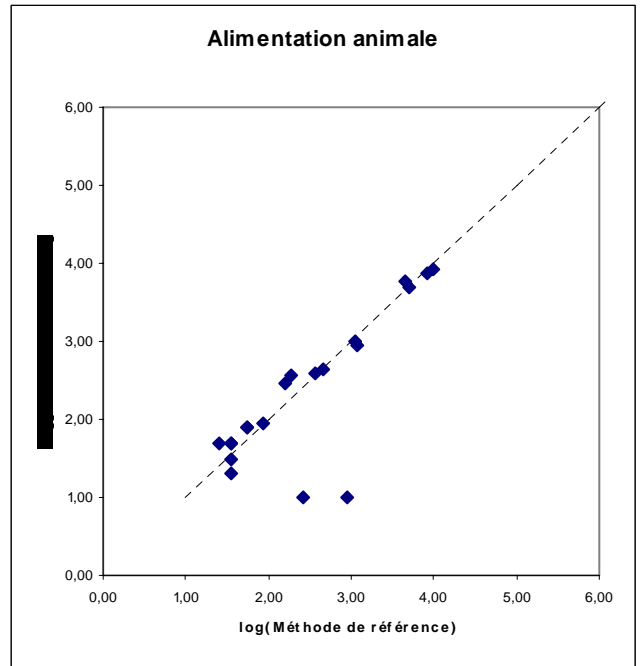
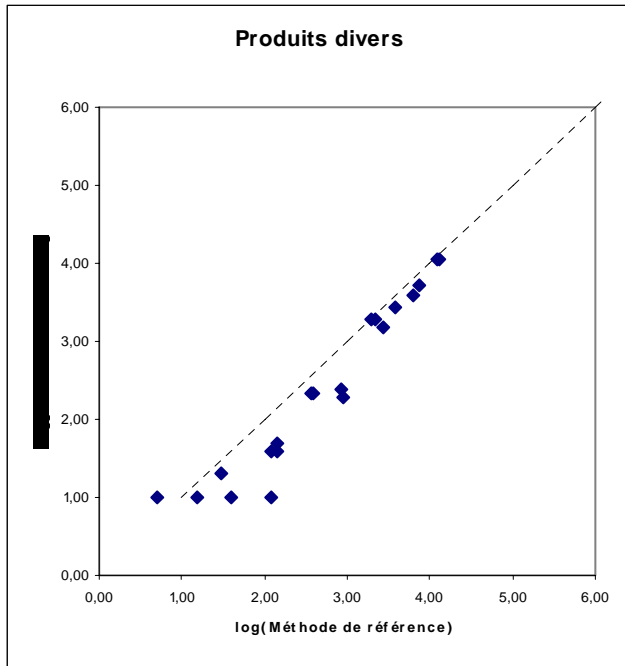
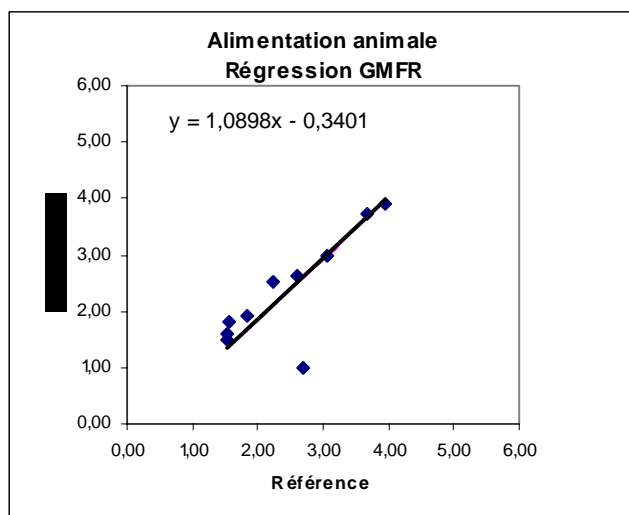
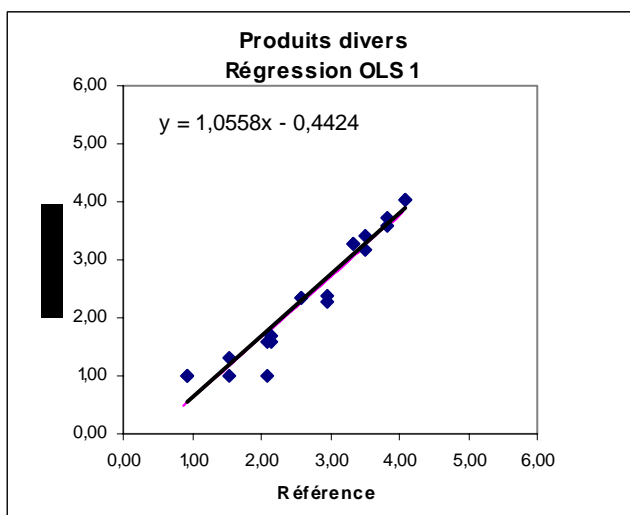
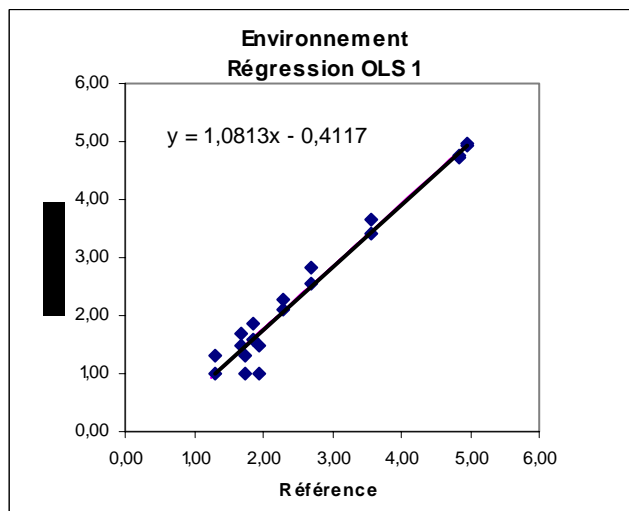
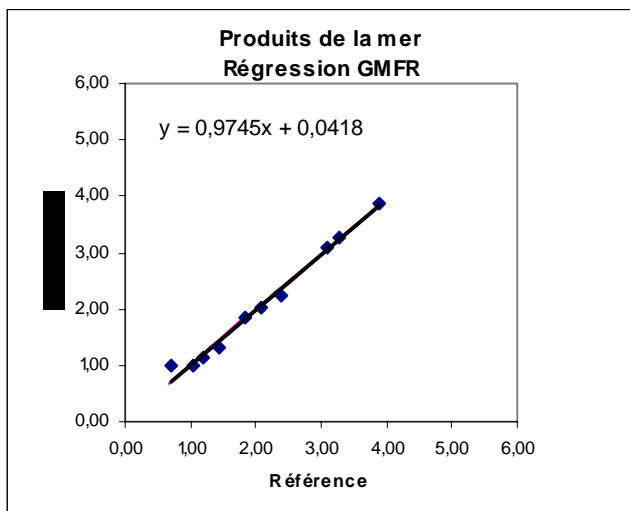
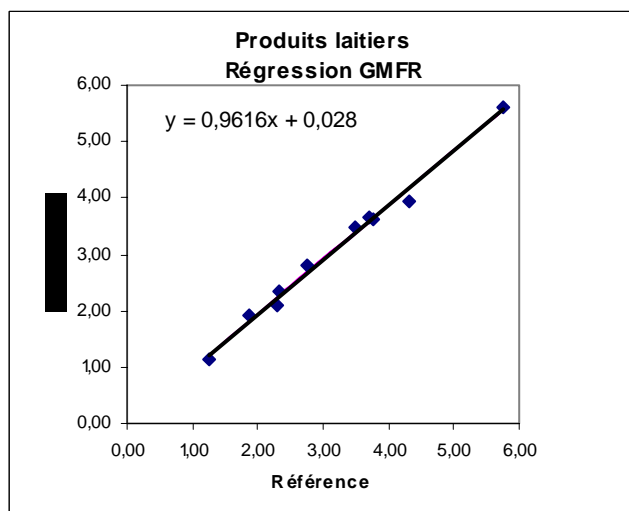
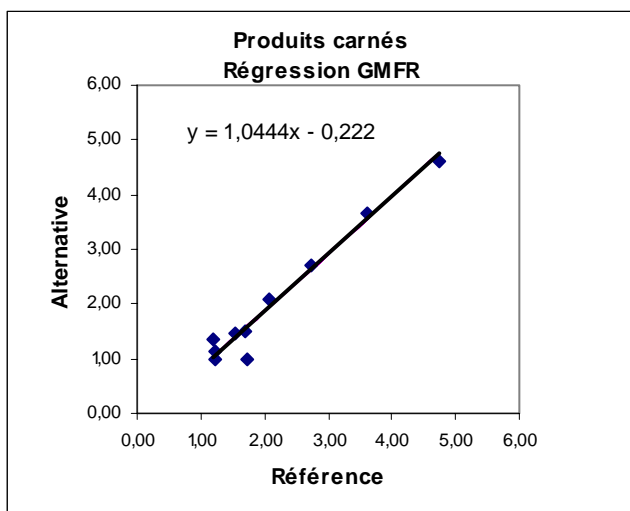
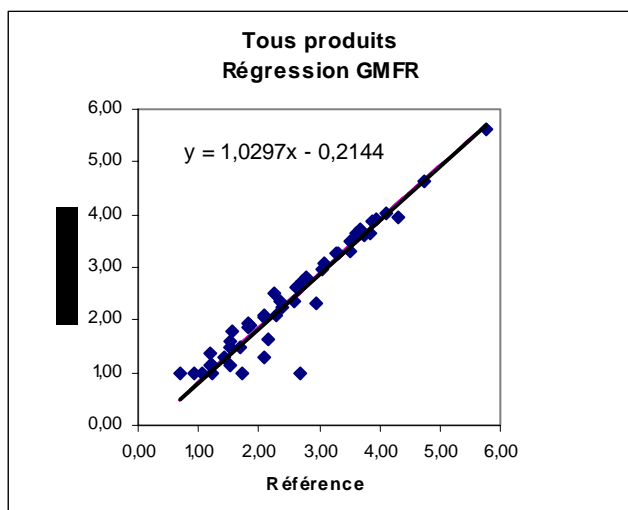


Figure 4 - Exactitude relative : droites de régression





□ **Interprétation statistiques selon la norme ISO16140**

Tableau 5- Récapitulatif de l'exactitude relative

Catégorie	R	Régression utilisée	a	t(a)	b	t(b)	T critique	P %		Coefficient de corrélation	Droite de régression
								Pente à 1	Ordonnée à 0		
Produits carnés	0,78	GMFR	-0,222	1,232	1,044	0,605	2,306	56	25	0,980	LogALT = 1,044logRéf-0,222
Produits laitiers	0,84	GMFR	0,028	0,262	0,962	1,22	2,306	26	80	0,996	LogALT = 0,962logRéf+0,028
Produits de la mer	1,55	GMFR	0,042	0,455	0,975	0,643	2,306	54	66	0,993	LogALT = 0,975logRéf+0,442
Divers	2,86	OLS1	-0,442	1,618	1,056	0,585	2,306	57	14	0,965	LogALT = 1,056logRéf-0,442
Alimentation animale	0,71	GMFR	-0,034	0,560	1,090	0,386	2,306	71	59	0,818	LogALT = 1,090logRéf-0,340
Echantillons de l'environnement	2,47	OLS1	-0,412	2,093	1,081	1,227	2,306	25	7	0,984	LogALT = 1,081logRéf-0,412
Tous produits	1,18	GMFR	-0,214	2,328	1,030	0,900	2,001	37	2	0,967	LogALT = 1,030logRéf-0,214

Tableau 6 - Calcul du biais et de la limite de répétabilité

Catégorie	Biais D	Répétabilité méthode alternative	Répétabilité méthode de référence
Produits carnés	- 0,073	0,264	0,338
Produits laitiers	- 0,070	0,235	0,279
Produits de la mer	- 0,023	0,250	0,161
Divers	- 0,215	0,294	0,102
Alimentation animale	0,022	0,176	0,250
Echantillons de l'environnement	- 0,103	0,690	0,279
Tous produits	- 0,050	0,294	0,264

□ **Conclusion**

La pente n'apparaît pas différente de 1 pour toutes les catégories, qu'elles soient testées individuellement ou confondues.

L'ordonnée à l'origine n'apparaît pas différente de 0 pour toutes les catégories testées individuellement. Elle n'apparaît pas significativement différente de 0 au risque de 2 % pour tous les produits confondus.

Les biais entre les deux méthodes sont faibles et varient entre - 0,103 et 0,022 log UFC/g. Les limites de répétabilité des deux méthodes sont similaires, excepté pour les échantillons de l'environnement pour lesquels une valeur plus élevée est observée pour la méthode alternative.

La méthode RAPID' *Staph* présente une exactitude relative satisfaisante vis-à-vis de la méthode de référence NF EN ISO 6888-1.

1.5.1.2 Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)

□ **Protocole**

La limite de détection a été réalisée à l'aide d'une culture de la souche *Staphylococcus aureus* 3.

Trois niveaux d'inoculation ont été testés, à raison de six réplicats par niveau. Les dénombrements des suspensions ont été effectués en inoculant 30 fois 1 ml de chaque suspension en milieu PCA.

Six mesures indépendantes de diluant peptone-sel ont également été réalisées afin de déterminer le bruit de fond.

□ **Résultats**

Les données sont intrinsèques à la méthode. Les interprétations sont données dans les tableaux suivants :

Tableau 7 - Récapitulatif

Niveau	Nombre d'échantillons "positifs"	Ecart-type So	Biais X0 (médiane des Xoi)
0	0/6	/	/
1	4/6	1,862	1,5
5	6/6	4,561	11
10	6/6	6,928	26

Tableau 8

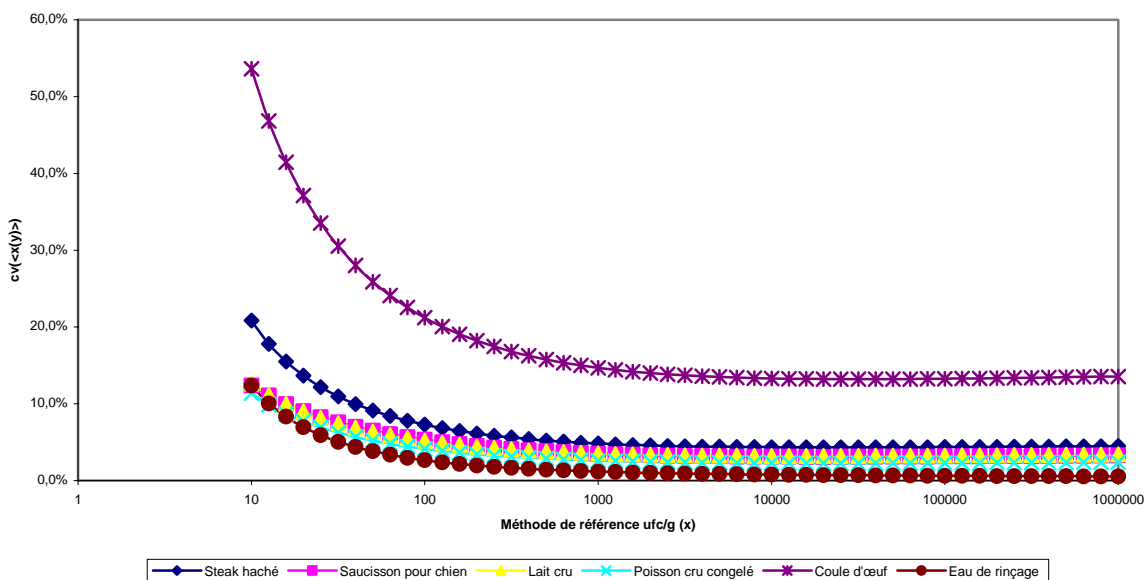
	Formules	Valeurs obtenues
LC	$1,65 S_0 + X_0$	4,6
LOD	$3,3 S_0 + X_0$	7,6
LOQ	$10 S_0 + X_0$	20,1

1.5.1.3 Sensibilité relative

Les données sont intrinsèques à la méthode. Elles sont obtenues à partir des résultats obtenus dans l'étude de linéarité.

Les profils de précision obtenus pour les différentes matrices sont présentés figure 5.

Figure 5 - Profils de précision obtenus pour les différentes matrices



1.5.1.4 Spécificité – Sélectivité

□ **Protocole**

30 souches cibles (à coagulase positive) et 20 souches non cibles (à coagulase négative) ont été testées en double par la méthode alternative et la méthode de référence.

□ **Résultats**

Les résultats bruts sont donnés en annexe 2.

Toutes les souches négatives testées (à coagulase négative) ont soit donné une absence de croissance sur le milieu RAPID'*Staph*, soit des colonies non caractéristiques avec un test latex négatif (PASTOREX® STAPH-PLUS) et une coagulase négative sur BP + RPF.

Lors de la réalisation de la méthode alternative, les souches *Staphylococcus aureus* Ad 421 et *Staphylococcus intermedius* CIP 81.60 ont montré de petites colonies difficilement dénombrables. Seule la souche appartenant à l'espèce *S. intermedius* n'a pas montré de test de confirmation positif par les méthodes PASTOREX® STAPH-PLUS et BP + RPF lors de la réalisation de la méthode alternative. Il est à noter que les souches *Staphylococcus aureus* Ad 421 et *Staphylococcus intermedius* CIP 81.60 ne montrent également qu'une légère auréole lors de la réalisation de la méthode de référence.

Le test de la coagulase de la méthode de référence montre une légère réaction pour 10 souches de *S. aureus* sur les 30 souches testées. Par contre, dans le cas de la méthode alternative, seules 4 lectures de coagulase sur BP + RPF, et une réaction du test PASTOREX® STAPH-PLUS s'avèrent faibles; il s'agit dans tous les cas de souches présentant une réaction similaire par la méthode de référence. Ainsi, dans la plupart des cas, les tests de confirmation proposés par la méthode alternative montrent de nettes réactions, facilitant l'étape de lecture.

□ **Conclusion**

La spécificité de la méthode RAPID'*Staph* est satisfaisante.

1.5.1.5 *Praticabilité*

Tableau 9 - Temps réel de manipulation et flexibilité par rapport au nombre d'échantillons à analyser (en minutes)

Etape	Méthode NF EN ISO 6888-1		Méthode RAPID' <i>Staph</i>	
	1 échantillon	20 échantillons	1 échantillon	20 échantillons
Prélèvement	4	45	4	45
Ajout diluant Broyage	2	15	2	15
Dilutions Ensemencement	2,5	71	1,25	35
Lecture RAPID' <i>Staph</i>			1,25	60
Lecture BP Agar 24 h	2,0	25		
Test PASTOREX® STAPH-PLUS			5	38
Test coagulase sur BP + RPF			5	38
Lecture coagulase BP + RPF			0,5	5
Lecture Agar 48 h	2	25		
Repiquage en BHI	10	187		
Test coagulase	13	244		
Lecture coagulase	2	37		
Total	37,5	649	19	236
Total/échantillon	37,5	32,5	19	11,8

1.5.2 Etude interlaboratoire

1.5.2.2 *Préparation*

L'étude a été menée sur du lait pasteurisé demi écrémé. Douze laboratoires ont participé à l'étude. La liste est donnée en annexe 3.

1.5.2.3 *Analyses*

Les laboratoires collaborateurs et le laboratoire expert ont effectué les analyses à la fois par la méthode alternative et la méthode de référence.

1.5.2.4 Résultats

□ **Résultats obtenus par les laboratoires collaborateurs**

Tableau 10 - Synthèse des résultats obtenus par la méthode RAPID'Staph et la méthode ISO 6888-1 (en UFC/ml)

Laboratoires	Niveau 0				Niveau 1				Niveau 2				Niveau 3			
	Méthode de référence		Méthode RAPID'Staph		Méthode de référence		Méthode RAPID'Staph		Méthode de référence		Méthode RAPID'Staph		Méthode de référence		Méthode RAPID'Staph	
A	<10	<10	<10	<10	40	40	70	30	510	440	460	410	4900	5100	4500	4100
B	<10	<10	<10	<10	55	60	60	<10	500	560	320	440	4500	5400	4800	4500
C	<10	<10	<10	<10	30	40	20	50	450	480	360	300	3000	5000	4500	4000
D	<10	<10	<10	<10	40	35	60	90	760	530	530	690	8400	8200	8000	6900
E	<10	<10	<10	<10	25	20	70	20	450	330	480	460	4800	7500	5500	7800
F	<10	<10	<10	<10	40	30	160	90	540	450	1000	770	4800	5100	15000	8100
G	<10	<10	<10	<10	55	35	40	30	480	380	200	300	4300	4000	3300	2400
H	<10	<10	<10	<10	40	40	50	40	460	340	330	510	5300	5400	3500	4200
I	<10	<10	<10	<10	10	25	10	70	490	420	390	370	4100	3600	3700	4400
J	<10	<10	<10	<10	35	65	20	10	470	540	120	3300	4900	5600	7300	5200
L	50	<10	<10	<10	10	30	20	50	310	460	380	450	4500	4500	4800	3200
N	<10	<10	<10	<10	35	35	50	60	400	510	520	390	4600	3700	2400	4500

□ **Interprétation statistique**

➤ **Biais**

Tableau 11 - Valeurs de t(d) obtenues par niveau

Niveau	Biais D	t(d)	t critique	Conclusion
1 (n = 11)	0,13	1,75	2,229	Biais D Non significatif
2 (n = 12)	-0,01	0,25	2,201	Biais D Non significatif
3 (n = 12)	- 0,03	1,13	2,201	Biais D Non significatif

➤ Répétabilité

Tableau 12 - Valeurs obtenues pour la limite de répétabilité et valeurs pour le Test F

Niveau	Limite de répétabilité		F calculé	F critique	P %
	Méthode de référence	Méthode alternative			
1 (n = 11)	0,352	0,881	6,25	2,82	0,3
2 (n = 12)	0,264	0,338	1,63	2,69	20,4
3 (n = 12)	0,117	0,323	7,56	2,69	0,07

➤ Reproductibilité

Tableau 13 - Valeurs obtenues pour la limite de reproductibilité et valeurs pour le Test F

Niveau	Limite de t=reproductibilité		F calculé	F critique	P %
	Méthode de référence	Méthode alternative			
1 (n = 11)	0,365	0,881	5,18	2,97	0,8
2 (n = 12)	0,268	0,377	1,98	2,82	13,6
3 (n = 12)	0,280	0,461	2,72	2,82	5,6

Tableau 14 - Rapports répétabilité / Reproductibilité

	Répétabilité/ reproductibilité	
	Méthode de référence	Méthode alternative
Niveau 1	1,037	0,944
Niveau 2	1,014	1,118
Niveau 3	2,383	1,428

➤ Dispersion entre laboratoires

Tableau 15 - Dispersion entre les laboratoires

	Méthode de référence	Méthode alternative	F critique (0,05 ; n-1 ; n)
Niveau 1	1,15	0,78 (1/F = 1,28)	2,86
Niveau 2	1,06	1,50	2,72
Niveau 3	10,35	3,08	2,72

□ **Discussion**

Le biais entre la méthode de référence et la méthode *RAPID'Staph* est non significatif pour les 3 niveaux testés.

La limite de répétabilité de la méthode *RAPID'Staph* ne diffère pas de celle de la méthode de référence pour le niveau 2. Elle diffère pour le niveau 1 qui implique la réalisation d'estimations de petits nombres. Elle diffère pour le niveau 3 si on considère les résultats du laboratoire F : il est à noter, dans ce cas, que la méthode de référence présente une limite de répétabilité faible (0,117). La méthode *RAPID'Staph* offre cependant une limite de répétabilité satisfaisante (0,323) pour le niveau 3. En absence des résultats du laboratoire F, les limites de répétabilité de la méthode *RAPID'Staph* et de la méthode de référence sont similaires.

Les limites de reproductibilité de la méthode de référence et de la méthode *RAPID'Staph* sont similaires pour les niveaux 2 et 3. Comme attendu, l'absence des résultats du laboratoire F améliore la limite de reproductibilité de la méthode *RAPID'Staph*. Elle diffère pour le niveau 1 qui implique la réalisation d'estimations de petites nombres. La limite de reproductibilité de la méthode alternative, bien que plus élevée que celle de la méthode de référence, s'avère cependant satisfaisante (0,461).

La valeur du rapport « répétabilité/reproductibilité », souhaitée selon la norme ISO 16140, est systématiquement observée pour tous les niveaux testés par la méthode *RAPID'Staph*.

Enfin, la dispersion des résultats entre laboratoires est meilleure par la méthode *RAPID'Staph* que par la méthode de référence pour les niveaux 1 et 3. Elle est d'ordre similaire entre les deux méthodes pour le niveau 2.

1.5.3 Conclusion

La méthode *RAPID'Staph* montre une linéarité, une exactitude relative et une sensibilité relative satisfaisantes. La méthode *RAPID'Staph* est spécifique et sélective.

L'intérêt majeur de la méthode *RAPID'Staph* réside dans le gain de temps à la réalisation des manipulations, dans le délai d'obtention des résultats, dans l'interprétation aisée des tests de confirmation proposés.

2 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

La méthode *RAPID'Staph* a été validée selon le protocole AOAC (Performance Tested Method).

Quatre types d'aliments ont été étudiés :

- lait entier pasteurisé,
- crème pâtissière,
- jambon cuit,
- saumon fumé.

Les performances de la méthode *RAPID'Staph* ont été comparées à celles de la méthode AOAC 975.55. Les résultats paraissent concordants.

Les tests d'inclusivité et d'exclusivité étaient 100 % satisfaisants.

Aucune discordance n'a été observée entre les résultats obtenus avec la méthode *RAPID'Staph* prêt à l'emploi ou le milieu déshydraté. Ces résultats ont été publiés dans J. AOAC Int. 2007, 90 (2) :414-26.

Annexe 1 - Exactitude relative : résultats

Catégorie	N° Ech.	Produit	Méthode de référence ISO 6888-1 *					Méthode alternative RAPID' Staph				
			ufc/g	ufc/g	log ufc/g	log ufc/g	log ufc/g	ufc/g	ufc/g	log ufc/g	log ufc/g	log ufc/g
			répétition 1	répétition 2	répétition 1	répétition 2	Moyenne	répétition 1	répétition 2	répétition 1	répétition 2	Moyenne
Produits carnés	295	Blanc de dinde	e 32	e 36	1,51	1,56	1,53	30	30	1,48	1,48	1,48
	296	Médaille de veau haché	<100	<100	<2,00	<2,00	<2,00	<10	<10	<1,00	<1,00	<1,00
	300	Foie	<1000	3600	<3,00	3,56	<3,28	30	50	1,48	1,70	1,59
	301	Rognon	<1000	<1000	<3,00	<3,00	<3,00	100	<100	2,00	<2,00	<2,00
	302	Chair à saucisse	500	<1000	2,70	<3,00	<2,85	<10	<10	<1,00	<1,00	<1,00
	303	Coppa	e 65000	e 50000	4,81	4,70	4,76	43000	41000	4,63	4,61	4,62
	304	Cuisses de poulet	e 27	e 9	1,43	0,95	1,19	50	10	1,70	1,00	1,35
	305	Escalope de dinde	<10	<10	<1,00	<1,00	<1,00	<10	<10	<1,00	<1,00	<1,00
	306	Lapin entier	<100	<100	<2,00	<2,00	<2,00	<10	20	<1,00	1,30	<1,15
	307	Magret de canard	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<100	<100	<2,00	<2,00	<2,00
	308	Pied de porc	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<100	<100	<2,00	<2,00	<2,00
	309	Jambon de Bayonne	70	<10	1,85	<1,00	<0,93	80	40	1,90	1,60	1,75
	310	Saucisses	30	10	1,48	1,00	1,24	10	20	1,00	1,30	1,15
	311	Steak haché de veau	10	<10	1,00	<1,00	<1,00	<10	<10	<1,00	<1,00	<1,00
	312	Involtini	<10	<10	<1	<1,00	<1,00	<10	<10	<1	<1	<1
	313	Masques de porc	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	10	30	1,00	1,48	1,24
	314	Cuisses de lapin	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>
	315	Gigolette de lapin	680	300	2,83	2,48	2,65	<10	<10	<1,00	<1,00	<1,00
320	Chipolatas	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<10	<10	<1	<1	<1	
323	Jambon sec	<10	<10	<1	<1	<1	<10	<10	<1	<1	<1	
510	Saucisse sèche	<i>illisible</i>	<i>illisible</i>	<i>illisible</i>	<i>illisible</i>	<i>illisible</i>	<i>illisible</i>	<i>illisible</i>	<i>illisible</i>	<i>illisible</i>	<i>illisible</i>	
511	Farce de veau	e 20	150	1,30	2,18	1,74	10	10	1,00	1,00	1,00	
Alimentation animale	486	Haché frais pour animaux	160	190	2,20	2,28	2,24	290	360	2,46	2,56	2,51
	487	Saucisson pour chien	e 35	e 35	1,54	1,54	1,54	50	30	1,70	1,48	1,59
	488	Bouchées pour chien	e 25	e 55	1,40	1,74	1,57	50	80	1,70	1,90	1,80
	512	Déchets pour animaux	<100	<100	<2	<2	<2	<10	<10	<1	<1	<1
	550	Aliment du bétail	e 35	e 35	1,54	1,54	1,54	<10	<10	<1,00	<1,00	<1,00
	551	Aliment du bétail	270	900	2,43	2,95	2,69	10	10	1,00	1,00	1,00
557	Viande hachée pour animaux	5000	4500	3,70	3,65	3,68	4900	5700	3,69	3,76	3,72	

e : estimation de petits nombres

* Essai effectué sous le couvert de l'accréditation

Catégorie	N° Ech.	Produit	Méthode de référence ISO 6888-1 ♦					Méthode alternative RAPID' Staph				
			ufc/g	ufc/g	log ufc/g	log ufc/g	log ufc/g	ufc/g	ufc/g	log ufc/g	log ufc/g	log ufc/g
			répétition 1	répétition 2	répétition 1	répétition 2	Moyenne	répétition 1	répétition 2	répétition 1	répétition 2	Moyenne
Produits laitiers	297	Saint Nectaire	3000	5100	3,48	3,71	3,59	<100	200	<1,00	2,30	<1,63
	298	Saint Nectaire fermier	600000	540000	5,78	5,73	5,76	340000	490000	5,53	5,69	5,61
	299	Comté	12000	37000	4,08	4,57	4,32	9100	8100	3,96	3,91	3,93
	316	Maroille	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>
	317	Crottin de Chavignol	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>	<i>ininterprétable</i>
	318	Lait cru	500	2000	2,70	3,30	3,00	100	1000?	2,00	3?	2,50
	319	Crème crue	<1000	<1000	<3	<3	<3	140	70	2,15	1,85	2,00
	321	Lait cru	1500	5000	3,18	3,70	3,44	2800	1400	3,45	3,15	3,30
	322	Crème crue	4800	6800	3,68	3,83	3,76	4200	4200	3,62	3,62	3,62
	398	Lait cru	170	220	2,23	2,34	2,29	100	160	2,00	2,20	2,10
RA800651	Poudre de lait	3100	3300	3,49	3,52	3,50	2900	3300	3,46	3,52	3,49	
Produits de la mer	467	Filet de St Pierre	e 15	e 15	1,18	1,18	1,18	10	20	1,00	1,30	1,15
	468	Filet de sole	e 25	e 5	1,40	0,70	1,05	10	10	1,00	1,00	1,00
	469	Aile de raie	e 5	e 5	0,70	0,70	0,70	10	10	1,00	1,00	1,00
	470	Thon cuit	<10	15	<1	1,18	<1,59	<10	10	<1	1,00	<1
	509	Saumon fumé	e 90	e 50	1,95	1,70	1,83	100	50	2,00	1,70	1,85
	549	Filet de colin pané surgelé	1900	1900	3,28	3,28	3,28	2000	1700	3,30	3,23	3,27
Divers	546	Sandwich poulet crudités	<10	<10	<1,00	<1,00	<1,00	<10	<10	<1,00	<1,00	<1,00
	547	Coule d'œuf pasteurisée	e 140	e 80	2,15	1,90	2,02	<10	<10	<1,00	<1,00	<1,00
	548	Œuf en gelée	120	120	2,08	2,08	2,08	40	10	1,60	1,00	1,30
	552	Forêt noire	7400	6200	3,87	3,79	3,83	5300	4000	3,72	3,60	3,66
	553	Gratin de courgettes	13000	12000	4,11	4,08	4,10	11000	11000	4,04	4,04	4,04
	554	Coule d'œuf pasteurisée	e 60	e 55	1,78	1,74	1,76	<10	<10	<1,00	<1,00	<1,00
	555	Sandwich poulet	2000	2200	3,30	3,34	3,32	1900	1900	3,28	3,28	3,28
556	Eclair au café	860	910	2,93	2,96	2,95	240	190	2,38	2,28	2,33	
Echantillons de l'environnement	513	Table atelier poisson	e 120	e 45	2,08	1,65	1,87	<10	<10	<1	<1	<1
	514	Marbre atelier pâtisserie	400	410	2,60	2,61	2,61	<10	<10	<1	<1	<1
	515	Boude d'égout atelier	e 70	e 45	1,85	1,65	1,75	20	10	1,30	1,00	1,15
	516	Sol atelier salaison	110	70	2,04	1,85	1,94	30	10	1,48	1,00	1,24
	517	Eau de rinçage	e 40	e 60	1,60	1,78	1,69	50	30	1,70	1,48	1,59
	544	Prélèvement de surface	100000	79000	5,00	4,90	4,95	91000	84000	4,96	4,92	4,94
	545	Eau de rinçage	75000	61000	4,88	4,79	4,83	53000	56000	4,72	4,75	4,74

e : estimation de petits nombres

♦ Essai effectué sous le couvert de l'accréditation

Annexe 2 - Spécificité et sélectivité : résultats

SOUCHES POSITIVES											
N°souche	Souche	Origine	PCA ufc/boite	Méthode de référence NF EN ISO 6888-1			Méthode RAPID' <i>Staph</i>				
				Aspect colonies	Coagulase (Plasma de lapin)	Résultat final	Aspect colonies	ufc/boite	PASTOREX® STAPH-PLUS	Coagulase	Résultat final
1	Staphylococcus aureus 3	Lait cru	70	NC(Très légère auréole)	+	+	C	93	+	+	+
				NC	+	+	très légère auréole	80	+	+	+
2	Staphylococcus aureus 242	Munster	62	C	+	+	C	108	+	+	+
				C	+	+	C	160	+	+	+
3	Staphylococcus aureus 501	Lait cru	76	C	+	+	C	113	+	+	+
				C	+	+	C	116	+	+	+
4	Staphylococcus aureus A00M071	Thon cuit	55	C	+	+	C	107	+	+	+
				C	+	+	C	95	+	+	+
5	Staphylococcus aureus Ad 422	Blanc de dinde	144	C	+(molle)	+	C (petites)	168	+(très faible)	+(très faible)	+
				C	+(molle)	+	C (petites)	143	+(très faible)	+(très faible)	+
6	Staphylococcus aureus Ad152	Lapin	57	C	+	+	C	107	+	+	+
				C	+	+	C	92	+	+	+
7	Staphylococcus aureus Ad153	Lapin	92	C	+(très faible)	+	C	107	+	+	+
				C	+(très faible)	+	C	107	+	+	+
8	Staphylococcus aureus Ad154	Filet de colin	49	C	+	+	C	88	+	+	+
				C	+	+	C	118	+	+	+
9	Staphylococcus aureus Ad155	VSM de dinde	115	C	+(molle)	+	C	165	+	+	+
				C	+(molle)	+	C	153	+	+	+
10	Staphylococcus aureus Ad159	Escalope de poulet	135	C	+	+	C	114	+	+	+
				C	+	+	C	108	+	+	+
11	Staphylococcus aureus Ad161	Merguez	51	C	+	+	C	117	+	+	+
				C	+	+	C	112	+	+	+
12	Staphylococcus aureus Ad163	Corail d'écrevisse	90	C	+	+	C	132	+	+	+
				C	+	+	C	140	+	+	+
13	Staphylococcus aureus Ad164	Viande de sanglier	73	C	+	+	C	105	+	+	+
				C	+	+	C	97	+	+	+
14	Staphylococcus aureus Ad166	Cuisse de poulet	131	C	+	+	C	98	+	+	+
				C	+	+	C	128	+	+	+
15	Staphylococcus aureus Ad167	Poitrine fumée crue	77	C (légère auréole)	+	+	NC	100	+	+	+
				C (légère auréole)	+	+	NC	61	+	+	+

SOUCHES POSITIVES											
N° souche	Souche	Origine	PCA ufc/boîte	Méthode de référence NF EN ISO 6888-1			Méthode RAPID' <i>Staph</i>				
				Aspect colonies	Coagulase (Plasma de lapin)	Résultat final	Aspect colonies	ufc/boîte	PASTOREX® STAPH-PLUS	Coagulase (BP+RPF)	Résultat final
16	Staphylococcus aureus Ad168	Viande de volaille hachée	85	C	+(faible)	+	C	120	+	+	+
				C	+(faible)	+	C	141	+	+	+
17	Staphylococcus aureus ATCC 25923	milieu clinique	112	C	+	+	C	104	+	+	+
				C	+	+	C	115	+	+	+
18	Staphylococcus aureus ATCC 51740	Margarine	83	C	+	+	C	96	+	+	+
				C	+	+	C	133	+	+	+
19	Staphylococcus aureus ATCC 8095	Tarte à la crème	132	C	+	+	C	130	+	+	+
				C	+	+	C	126	+	+	+
20	Staphylococcus aureus 605	Lait cru	116	C	+	+	C	107	+	+	+
				C	+	+	C	117	+	+	+
21	Staphylococcus aureus Ad162	Merguez	93	C	+(molle)	+	C	110	+	+	+
				C	+(molle)	+	C	119	+	+	+
22	Staphylococcus aureus Ad157	Peau de poulet	127	C	+(molle)	+	C	131	+	+	+
				C	+(molle)	+	C	103	+	+	+
23	Staphylococcus aureus Ad158	Cuisse de poulet	95	C	+(molle)	+	C	98	+	+	+
				C	+(molle)	+	C	119	+	+	+
24	Staphylococcus aureus Ad160	Steak haché	100	C	+	+	C	122	+	+	+
				C	+	+	C	109	+	+	+
25	Staphylococcus aureus 156		82	C	+	+	C	114	+	+(faible)	+
				C	+	+	C	110	+	+(faible)	+
29	Staphylococcus aureus A00M074	Poisson	98	C	+(molle)	+	C	94	+	+(faible)	+
				C	+(molle)	+	C	114	+	+(faible)	+
30	Staphylococcus aureus A00M077	Poisson	110	C	+(molle)	+	C	120	+	+(faible)	+
				C	+(molle)	+	C	109	+	+(faible)	+
31	Staphylococcus aureus Ad 421		132	C (légère auréole)	+(molle)	+	NC(petites)	/	+	+	-
				C (légère auréole)	+(molle)	+	NC(petites)	/	+	+	-
32	Staphylococcus aureus Ad 165	Charcuterie fumée crue	86	C (légère auréole)	+	+	NC (noires)	77	+	+	-
				C (légère auréole)	+	+	NC (noires)	80	+	+	-
33	Staphylococcus intermedius CIP 81.60	Pigeon	161	C (légère auréole)	+	+	NC (microscopiques)	/	-	-	-
				C (légère auréole)	+	+	NC (microscopiques)	/	-	-	-

SOUCHES NEGATIVES											
N° souche	Souche	Origine	PCA ufc/boite	Méthode de référence NF EN ISO 6888-1			Méthode RAPID' <i>Staph</i>				
				Aspect colonies	Coagulase (Plasma de lapin)	Résultat final	Aspect colonies	ufc/boite	PASTOREX® STAPH-PLUS	Coagulase (BP+RPF)	Résultat final
1	Candida albicans IP4872	Humaine	277	/	/	-	/	0	/	/	-
				/	/	-	/	0	/	/	-
2	E.coli 1	Saucisse de Toulouse	71	/	/	-	/	0	/	/	-
				/	/	-	/	0	/	/	-
3	E.coli 15	Lait cru	139	/	/	-	/	0	/	/	-
				/	/	-	/	0	/	/	-
4	Kluyveromyces lactis	Salade	99(OGA 48H)	/	/	-	/	0	/	/	-
				/	/	-	/	0	/	/	-
5	Kluyveromyces marxianus CLIB 720	Lait cru	150(OGA 48H)	/	/	-	/	0	/	/	-
				/	/	-	/	0	/	/	-
6	Carnobacterium 503 M10		52	/	/	-	/	0	/	/	-
				/	/	-	/	0	/	/	-
7	Micrococcus luteus ATCC10240	air	364(BHIA 48H)	/	/	-	/	0	/	/	-
				/	/	-	/	0	/	/	-
8	Kocuria rosea CIP 71.15		157(BHIA 48H)	/	/	-	/	0	/	/	-
				/	/	-	/	0	/	/	-
9	Pichia membranefaciens 342	Bière	136(OGA 48H)	/	/	-	/	0	/	/	-
				/	/	-	/	0	/	/	-
10	Rhodococcus equi ATCC 4349		120	/	/	-	/	0	/	/	-
				/	/	-	/	0	/	/	-

SOUCHES NEGATIVES											
N° souche	Souche	Origine	PCA ufc/boite	Méthode de référence NF EN ISO 6888-1			Méthode RAPID' <i>Staph</i>				
				Aspect colonies	Coagulase (Plasma de lapin)	Résultat final	Aspect colonies	ufc/boite	PASTOREX® STAPH-PLUS	Coagulase (BP+RPF)	Résultat final
11	Staphylococcus carnosus	Ferment	64	NC(petites, noires)	-	-	/	0	/	/	-
				NC(petites, noires)	-	-	/	0	/	/	-
12	Staphylococcus carnosus	Ferment	32	NC(petites, noires)	-	-	/	0	/	/	-
				NC(petites, noires)	-	-	/	0	/	/	-
13	Macroccoccus caseolyticus CIP 100755	Lait	25 (48h)	NC(petites, noires)	-	-	/	0	/	/	-
				NC(petites, noires)	-	-	/	0	/	/	-
14	Staphylococcus cohnii conhii Ad 156	Peau de poulet	166	NC(noires)	-	-	NC petites grises	0	-	-	-
				NC(noires)	-	-	NC petites grises	4	-	-	-
15	Staphylococcus epidermidis Ad150	steak haché	83	NC	/	-	/	0	/	/	-
				NC	/	-	/	0	/	/	-
16	Staphylococcus equorum CIP 103502	Peau de cheval	44(48H)	NC(grises)	-	-	NC beiges microscopiques	microcolonies	-	-	-
				NC(grises)	-	-	NC beiges microscopiques	microcolonies	-	-	-
17	Staphylococcus hyicus CIP 81.58	Porc	99	NC	-	-	NC petites grises	161	-	-	-
				NC	-	-	NC petites grises	161	-	-	-
18	Listeria ivanovii CIP 108466		36	NC	-	-	NC	11		-	-
				NC	-	-	NC	11		-	-
19	Staphylococcus saprophyticus ATCC 15305	Urine	29	/	/	-	/	0	/	/	-
				/	/	-	/	0	/	/	-
20	Staphylococcus xylosus AD 151	Steak haché	36(48H)	/	/	-	/	0	/	/	-
				/	/	-	/	0	/	/	-

Annexe 3 - Liste des laboratoires collaborateurs

Nom et adresse	
BCS BV F. de Nooijer Laboratorium Microbiologie Heerenweg 7 2222 AM Katwijk (Pays-Bas)	National veterinary Research Institute Dr. Hanna Rozanska Depart. of Hygiene of Food od Animal orifin Al.Partyzantow 57 24 100 Pulawy (Pologne)
BONDUELLE Madame FOURNIER Usine D'Estrées-Mons 80203 PERONNE (France)	Nutrilab BV P. Scheurwater Laboratorium Microbiologie Burgstraat 12 4283 GG Giessen (Pays-Bas)
Deutsches Institut für Lebensmitteltechnologie Dr. Daniel Dietrichs Abt. Mikrobiologie Prof.-v.-Klitzing-Straße 7 D-49610 Quakenbrück (Allemagne)	QUALITY PARTNER S.A. Mr Jean-Yves FRANCOIS Rue Hayeneux 62 B-4040 HERSTAL (Belgique)
UCL-Michamps Laboratoire d'Ecologie des Prairies Mr Claude JACOB Horritine B-6600 MICHAMPS (BASTOGNE) Belgique	Research Institute of Foods Mrs Eva Kaclikova Priemyslna 4 824 75 Bratislava (Slovaquie)
LVD 24 Monsieur MERGNAT Avenue Churchill 24660 COULOUNIEIX CHAMIERES (France)	SOCIETE LEM LABORATOIRE Mademoiselle CHATELLENAZ 38 Rue De L'industrie 67400 ILLKIRCH (France)
LDV 19 Madame SELVE Le Treuil - BP 202 19012 Tulle Cedex (France)	Statni zemedelska a potravinarska inspekce Mrs Eva Pavlikova Za opravnou 4 150 06 Praha 5 (République Tchèque)

Trois autres laboratoires étaient prévus initialement ; ils n'ont pas pu participer à l'étude du fait d'un problème de livraison.