



***Validation de la méthode
Oxoid Listeria Rapid Test (OLRT)
pour la recherche de Listeria spp***

Rapport de synthèse

Etudes comparative et interlaboratoire selon le référentiel
EN ISO 16140



Etude réalisée par :

L'INSTITUT PASTEUR DE LILLE
S.E.R.M.H.A.
Domaine du CERTIA - BP 20039
369, Rue Jules Guesde
59651 VILLENEUVE D'ASCQ CEDEX

pour :

OXOID
6, Route de Paisy
69571 Dardilly Cedex

1 Introduction

1.1 Référentiels de validation

Les compléments d'étude de reconduction de validation de la méthode Oxoid *Listeria* Rapid Test (OLRT) ont été réalisés selon le référentiel EN ISO 16140 afin que la validation soit conforme au référentiel EN ISO 16140.

1.2 Protocole et principe de la méthode alternative

1.2.1 Protocole

Le protocole est le suivant :

- une étape d'enrichissement en Fraser demi (24h-26h à 30°C),
- suivie d'un repiquage de 0,1mL en bouillon BLEB, incubé 24h-26h à 30°C.

NB : dans le cadre de la validation, les durées minimales d'incubation doivent être testées. Suite aux premiers résultats obtenus lors de cette étude, ces durées minimales d'incubation ont été revues.

Elles passent de 21 heures à 24 heures.

*En effet, il s'avère que des difficultés ont été rencontrées pour obtenir des tests OLRT positifs dans le cas d'échantillons faiblement contaminés en *Listeria* et fortement chargés en flore interférente. En revanche, l'augmentation des durées d'incubation a conduit à des résultats beaucoup plus satisfaisants.*

Le test OLRT est ensuite mis en œuvre :

- chauffage de 2 ml de bouillon BLEB 20 minutes à 80°C
- dépôt de 135 µl (+/- 0,8%) d'extrait sur la fenêtre échantillon d'une plaquette unitaire
- lecture du résultat après 20 minutes maximum

Les échantillons présumés positifs sont confirmés à partir du bouillon BLEB non chauffé :

- isolé sur géloses PALCAM ou Oxford, les colonies caractéristiques de *Listeria* étant ensuite identifiées par les tests classiques
- ou
- isolé sur gélose chromogène OCLA, l'aspect typique de *Listeria* sur cette gélose suffisant à confirmer le résultat positif du test OLRT. Cette option permettra la confirmation du genre.

Si une confirmation de l'espèce est souhaitée, une galerie d'identification sera alors réalisée, sans purification préalable si la colonie est suffisamment isolée. Le cas échéant, une vérification de la pureté de la souche pourra être mise en œuvre en réalisant en parallèle un isolement sur gélose TSA.

D'autre part, les bouillons BLEB non chauffés peuvent être conservés jusqu'à 72 heures à 2°C - 8°C avant la réalisation du test OLRT : les essais ont été réalisés dans cette étude sur les échantillons positifs de l'étude d'exactitude, afin de vérifier que cette conservation ne modifiait pas le résultat et que les confirmations étaient toujours envisageables.

Un schéma de la méthode est présenté en annexe A.

1.2.2 Principe du test

Le test se présente sous la forme d'une plaquette unitaire.

Il est basé sur une réaction immunochromatographique : les antigènes spécifiques de *Listeria* réagissent avec des particules de latex bleu sensibilisées avec un anticorps. Ce complexe migre le long du support par capillarité, vers une bandelette réactive contenant une ligne d'anticorps immobilisés.

La présence d'antigènes flagellaires de *Listeria* permet la réaction entre le complexe et les anticorps immobilisés, réaction qui se manifeste par une ligne bleue.

1.3 Domaine d'application

- tous produits d'alimentation humaine
- échantillons de l'environnement

1.4 Méthode de référence

L'étude de validation a été réalisée par rapport à la méthode de référence EN ISO 11290-1/A1 :2004.

Le schéma de la méthode figure en annexe A.

1.5 Historique de la validation

La méthode Oxoid *Listeria* Rapid Test est validée sous le numéro d'attestation UNI-03/2-04/95 :

- avril 1995 : validation initiale pour l'alimentation humaine
- avril 1999 : reconduction pour l'alimentation humaine
- juin 2003 : reconduction pour l'alimentation humaine, incluant une possibilité de confirmation des test positifs sur gélose OCLA

Les méthodes de référence utilisées étaient les suivantes :

- validation initiale : norme expérimentale V 08-055 (1993) « Recherche de *Listeria monocytogenes* – Méthode de routine »
- reconductions : NF EN ISO 11290-1 (1997) « Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* – Partie 1 : Méthode de recherche »

Les principaux éléments liés à la méthode Oxoid *Listeria* Rapid Test depuis 1995 sont repris en annexe B.

Deux modifications ont eu lieu depuis les précédentes études de reconduction et d'extension :

- modification du référentiel de validation : application de la norme EN ISO 16140,
- modification de la méthode de référence en 2004, avec la modification des milieux d'isolement (cf. annexe A).

L'étude de reconduction a donc été revue afin d'être conforme aux référentiels en vigueur.

2 Etude comparative des méthodes

2.1 Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative

L'objectif de cette étude, selon le référentiel EN ISO 16140, est de comparer les performances des deux méthodes:

- la méthode de référence NF EN ISO 11290-1 :2005,
- la méthode OLRT,

sur des échantillons naturellement contaminés et non contaminés en *Listeria monocytogenes* et en autres *Listeria*.

Suite aux modifications des référentiels, cette étude a été réalisée dans son ensemble.

2.1.1 Nombre et nature des échantillons

Selon la norme EN ISO 16140, un minimum de 60 produits par catégorie doivent être analysés, avec environ 50% de produits positifs (au moins 30 résultats) et 50% de produits négatifs.

Chaque catégorie a été divisée en différents types et les résultats se répartissent de la manière suivante :

Catégories	Types	Positifs*	Négatifs	Total
Produits carnés	crus	7	4	11
	crus et préparés, prêts à cuire	13	8	21
	charcuteries, plats cuisinés, ...	10	19	29
	Total	30	31	61
Produits laitiers	fromages au lait de vache	10	14	24
	fromages au lait de chèvre ou de brebis	9	8	17
	desserts, poudres de lait, laits crus	11	10	21
	Total	30	32	62
Produits de la pêche	filets de poissons frais et crustacés	15	17	33
	poissons fumés	8	12	20
	plats cuisinés à base de poisson	7	8	15
	Total	30	37	67
Produits végétaux	surgelés	11	7	18
	frais ou 4ème gamme	11	11	22
	légumes cuits, préparés	8	18	26
	Total	30	36	66
Environnement	eaux diverses	11	5	16
	prélèvements de surface	12	21	33
	résidus	7	7	14
	Total	30	33	63
TOTAL		150	169	319

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

2.1.2 Contamination artificielle des échantillons et pourcentage

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

Elles concernent 44 résultats positifs. Au total, sur 150 résultats positifs en *Listeria spp.*, 29 % ont été obtenus suite à des contaminations artificielles.

2.1.3 Résultats des essais

Les analyses ont été réalisées en simple par les deux méthodes.

Les résultats obtenus pour les 319 échantillons analysés se répartissent de la manière suivante :

	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)	Total
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 144	Déviations positives (R-/A+) PD = 1	145
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 5*	Accord négatif (A-/R-) NA = 169**	174
Total	149	170	319

Légende :

A+ = positifs confirmés

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

* dont aucun résultat positif non confirmé

** dont 1 résultat positif non confirmé après isolement du bouillon BLEB

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

<u>produits carnés (61)</u>	Méthode de référence positive (R+)	Méthode référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 28	Déviations positives (R-/A+) PD = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 2	Accord négatif (A-/R-) NA = 31

<u>produits laitiers (62)</u>	Méthode de référence positive (R+)	Méthode référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 29	Déviations positives (R-/A+) PD = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 1	Accord négatif (A-/R-) NA = 32

<u>produits de la pêche (67)</u>	Méthode de référence positive (R+)	Méthode référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 30	Déviations positives (R-/A+) PD = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 0	Accord négatif (A-/R-) NA = 37

<u>produits végétaux (66)</u>	Méthode de référence positive (R+)	Méthode référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 28	Déviations positives (R-/A+) PD = 1
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 1	Accord négatif (A-/R-) NA = 36

<u>prélèvements d'environnement (63)</u>	Méthode de référence positive (R+)	Méthode référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 29	Déviations positives (R-/A+) PD = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 1	Accord négatif (A-/R-) NA = 33

2.1.4 Calcul de l'exactitude relative, de la spécificité relative et de la sensibilité relative

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.

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	28	31	2	0	61	96,7	30	93,3	31	100
Produits laitiers	29	32	1	0	62	98,4	30	96,7	32	100
Pêche	30	37	0	0	67	100	30	100	37	100
Végétaux	28	36	1	1	66	97,0	29	96,6	37	97,3
Environnement	29	33	1	0	63	98,4	30	96,7	33	100
TOTAL	144	169	5	1	319	98,1	149	96,6	170	99,4

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

<i>exactitude relative</i> : AC	98,1 %
<i>spécificité relative</i> : SP	99,4 %
<i>sensibilité relative</i> : SE	96,6 %

Le Bureau Technique AFNOR demande que la sensibilité des deux méthodes soit recalculée en tenant compte de l'ensemble des positifs confirmés (ceci inclut les positifs supplémentaires de la méthode alternative) :

Méthode alternative :	Méthode de référence :
(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 96,7 %	(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 99,3 %

2.1.5 Analyse des discordances

6 résultats discordants entre la méthode de référence et la méthode alternative ont été obtenus.

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

Il s'agit donc 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	1	Equivalence

Les deux méthodes ne sont pas considérées comme différentes.

2.1.6 Commentaires sur la conservation des bouillons BLEB pendant 72 heures à 2-8°C

Les échantillons positifs ont été retestés par le test OLRT et reconfirmés après une conservation du bouillon BLEB pendant 72 heures à 2-8°C. Globalement, les résultats sont équivalents à ceux retrouvés lorsque le test est réalisé directement après incubation.

- Deux résultats faux négatifs deviennent positifs concordants
- Un résultat positif concordant avec la méthode de référence devient faux négatif : il s'agit d'un prélèvement d'environnement naturellement contaminé par *Listeria seeligeri*. Il est à noter que pour cet échantillon, la confirmation sur gélose OCLA s'était révélée négative et que ces *Listeria seeligeri* n'avaient pu être mises en évidence qu'après isolement du bouillon BLEB sur gélose PALCAM, et en faible quantité. La souche n'a peut-être pas survécu lors de la conservation du bouillon BLEB.
- Le résultat faux positif de l'échantillon de crevettes est devenu négatif concordant. Il est possible qu'il y ait eu un problème de manipulation lors du premier test, d'autant plus qu'aucune colonie n'a été retrouvée sur les géloses sélectives isolées à partir du bouillon BLEB.

Enfin, les identifications réalisées suite à la conservation du bouillon BLEB sont identiques à celles réalisées directement après incubation, sauf un échantillon de terrine de poisson pour lequel deux espèces de *Listeria* avaient été identifiées en première confirmation (*Listeria monocytogenes* et *Listeria innocua*) et seule *Listeria innocua* a été retrouvée en deuxième confirmation.

2.1.7 Commentaires sur les confirmations

Les isollements du bouillon BLEB sur gélose OCLA après un test OLRT positif, ont toujours permis d'observer des colonies typiques de *Listeria*, sauf pour deux échantillons (un résultat faux positif et un prélèvement d'environnement contaminé par *Listeria seeligeri*).

Il est à noter que pour un échantillon de chipolatas, un échantillon de filet de saumon et un échantillon de chou rouge vinaigrette, il a été nécessaire de réincuber le bouillon BLEB pendant 24 supplémentaires pour retrouver des colonies typiques de *Listeria* (*Listeria welshimeri*, *Listeria welshimeri* et *Listeria innocua* respectivement).

Enfin, pour un échantillon de fromage de chèvre contaminé artificiellement par *Listeria monocytogenes*, il a été nécessaire d'incuber les géloses OCLA 48 heures afin de bien distinguer les halos. En 24 heures d'incubation, les colonies étaient trop petites pour statuer.

Les galeries d'identification ont été réalisées à partir des colonies typiques isolées sur gélose OCLA sans que cela ne pose de problème d'interprétation.

2.2 Niveau de détection relatif

L'objectif 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' doivent être étudiés en parallèle avec la méthode de référence et la méthode OLRT, pour cinq catégories.

Ces essais n'ont pas été réalisés lors des études précédentes.

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 :

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.welshimeri</i>	0,4 [0,2 – 0,8]	0,4 [0,2 – 0,8]
Lait cru	<i>L.ivanovii</i>	0,4 [0,3 – 0,7]	0,4 [0,3 – 0,7]
Saumon fumé	<i>L.monocytogenes</i> 1/2a	0,6 [0,4 – 0,9]	0,6 [0,4 – 0,9]
Mélange de légumes crus	<i>L.monocytogenes</i> 4b	0,8 [0,5 – 1,3]	0,8 [0,5 – 1,3]
Eau de process	<i>L.innocua</i>	0,5 [0,3 – 0,9]	0,5 [0,3 – 1,0]

* "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".

Conclusion

Le niveau de détection obtenu pour la méthode alternative est identique à celui obtenu pour la méthode de référence : il est compris entre à 0,2 et 1,3 cellules par 25 grammes.

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.

Les résultats de l'étude d'inclusivité et d'exclusivité ont été repris des études précédentes.

50 souches de *Listeria* et 42 souches non *Listeria* ont été testées à partir d'une culture en BLEB sans antibiotique :

⇒ aucune réaction croisée n'a été observée

⇒ à l'exception d'une souche de *Listeria grayi* qui n'a pas été mise en évidence (fait partie des restrictions d'emploi), l'ensemble des *Listeria* testées a été détecté.

Cette étude reste valable au regard du référentiel ISO 16140. Les résultats sont détaillés en annexe C.

3 Etude interlaboratoire

3.1 Organisation de l'étude

- Nombre de laboratoires participants

12 laboratoires étaient destinataires des échantillons.

- Matrice utilisée

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

- Souche utilisée

La souche utilisée pour les contaminations est une souche de *Listeria innocua* (L64), 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 et les estimations des précisions figurent dans le tableau ci-dessous :

Niveau	Echantillons	Taux théorique ciblé (b/25ml)	Taux réel (b/25ml d'échantillon)	Estimation de la limite inférieure de la contamination	Estimation de la limite supérieure de la contamination
Niveau 0 (L0)	1-4-7-8-13-16-17-22	0	0	/	/
Niveau bas (L1)	2-5-9-10-14-18-19-23	3	3,6	2,1	5,7
Niveau haut (L2)	3-6-11-12-15-20-21-24	30	41,8	36	48

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

3.2.2.1 Analyse des courbes de suivi de température au cours du transport

Les courbes de températures obtenues suite à l'exploitation des données des thermoboutons montrent que les températures sont stables au cours du transport et comprises entre 1,7°C et 9,2°C pour l'ensemble des laboratoires.

3.2.2.2 Températures à réception et délais de réception

Les températures obtenues sont reprises dans les tableaux ci-dessous :

Laboratoire	Températures à réception (°C)		Commentaires
	communiquée par le laboratoire	indiquée par le thermobouton	
A	6,5	3,6	Echantillons caillés (2,5,9,10,18,19,23,PCA)
B	4,5	4,6	/
C	6,5	5,1	/
D	2,3	1,7	/
E	5,1	2,7	/
F	2,5	1,7	/
G	13,2	2,1	/
H	4,1	4,2	Echantillons caillés
I	8,0	9,2	/
J	2,1	3,6	Echantillons caillés (3,6,11,12,15,20,21,24)
K	4,7	3,1	/
L	11,5	4,2	/

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

Parmi les 12 laboratoires, le laboratoire L avait annoncé une température à réception de 11,5°C et le laboratoire G, une température à réception de 13,2°C. L'analyse de la température pendant le transport et à réception montre une température comprise entre -0,9°C et 5,0°C pour le laboratoire L et comprise entre -1,4°C et 0°C pour le laboratoire G. Leurs résultats peuvent donc être exploités.

Les laboratoires A, H et J nous ont annoncé la présence d'échantillons caillés probablement dus à une flore interférente importante. Il conviendra donc de prendre ce paramètre en compte lors de l'exploitation des résultats.

Le laboratoire I nous avait annoncé une température à réception de 8,0°C. Suite à l'analyse du thermobouton, il a en fait reçu les échantillons à une température de 9,2°C. Ses résultats ne sont donc pas exploités.

Parmi les 12 laboratoires participants, il est donc possible d'analyser les résultats de 11 laboratoires à l'issue des conditions relatives au transport.

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
Total (résultats exploités)	0 (a)	88	88 (b)	88	88 (c)	88

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
Total (résultats exploités)	0 (a)	88	87 (b)	88	88 (c)	88

(a) : faux positif

(b) : vrai positif obtenu au niveau 1

(c) : vrai positif obtenu au niveau 2

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

Les résultats de la méthode de référence et de la méthode alternative sont **concordants** entre la méthode de référence et la méthode alternative pour **10** laboratoires.

Il est à noter que le laboratoire J a retrouvé six des échantillons contaminés au taux fort, douteux par la méthode la méthode alternative (il nous a signalé un signal faible dans la fenêtre « résultat » du test OLRT. Néanmoins, il a considéré ces résultats comme suspects et a engagé les confirmations qui se sont révélées positives. Ce laboratoire nous avait signalé que les échantillons concernés étaient arrivés « caillés » à leur arrivée. L'importance de la flore interférente a vraisemblablement influencé la nature du résultat OLRT.

Quant au onzième laboratoire, le laboratoire E, il a retrouvé un échantillon contaminé au faible taux, négatif par la méthode alternative et positif par la méthode de référence.

3.4 Calculs

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

Les pourcentages de spécificité (SP) et de sensibilité (SE) pour les deux méthodes ont été calculés selon les formules données par la norme EN ISO 16140.

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

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

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

Pour les niveaux L1 et L2, il est demandé de calculer le pourcentage de sensibilité (%SE) de chacune des méthodes, par rapport au nombre de résultats positifs attendus :

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

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

Les résultats sont repris dans le tableau ci-dessous :

Niveau	Méthode de référence		Méthode alternative	
	SP/SE	LCL * %	SP/SE	LCL * %
L0	SP% = 100	98	SP% = 100	98
L1	SE% = 100	98	SE% = 98,9	96
L2	SE% = 100	98	SE% = 100	98
L1+L2	SE% = 100	98	SE% = 99,5	98

* LCL : low critical value, définie par la norme ISO 16140

3.4.2 Calcul de l'exactitude relative (AC)

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 = 191	Déviations positives (R-/A+) PD = 0	(N+) = 191
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 1*	Accord négatif (A-/R-) NA = 96*	(N-) = 97
Total	(N+) = 192	(N-) = 96	N = 288

* dont aucun échantillon positif, non confirmé

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

3.4.3 Etude des résultats discordants

Selon l'annexe F de la norme EN ISO 16140, le nombre de discordants au delà duquel un test statistique doit être réalisé afin de comparer les deux méthodes est de 6. Ce test statistique n'est donc pas mis en œuvre puisqu'une seule discordance entre les deux méthodes a été observée.

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 collaborative	Etude préliminaire
Exactitude relative (AC)	99,7 %	98,1 %
Sensibilité (SE)	99,5 %	99,4 %
Spécificité (SP)	100 %	96,6 %

Les valeurs obtenues suite à l'étude collaborative sont du même ordre que celles obtenues lors de l'étude préliminaire pour l'exactitude relative et la spécificité.

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) (ceci inclut les positifs supplémentaires de la méthode alternative) :

	Méthode alternative :	Méthode de référence :
sensibilité	$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 99,5 \%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 100 \%$

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 D et les degrés d'accord pour chacune des méthodes, à chacun des niveaux sont repris dans le tableau ci-dessous :

Niveau	Méthode de référence	Méthode alternative
L0	DA % = 100 %	DA % = 100 %
L1	DA % = 100%	DA % = 98%
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 E et les pourcentages de concordance pour chacune des méthodes et à chacun des niveaux sont repris dans le tableau ci-dessous :

Niveau	Méthode de référence	Méthode alternative
L0	Concordance % = 100 %	Concordance % = 100 %
L1	Concordance % = 100 %	Concordance % = 97,8%
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 :

Niveau	Méthode de référence	Méthode alternative
L0	COR % = 1,00	COR % = 1,00
L1	COR % = 1,00	COR % = 1,15
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 OLRT.

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

1. Mode de conditionnement des éléments de la méthode (cf notice)	Les 50 tests unitaires et les 3 flacons de contrôles positifs sont conditionnés en coffrets.
2. Volume des réactifs (cf notice et emballage des flacons)	Les tests unitaires sont conditionnés individuellement. Les contrôles positifs sont à reconstituer dans 2ml d'eau distillée stérile.
3. Condition de stockage des éléments (cf notice) – Péréemption des produits non ouverts (cf notice)	La température de stockage est de 2-8 °C. Les péréemptions sont précisées sur le coffret et sur chaque test unitaire.
4. Modalités d'utilisation après première utilisation (cf notice)	Les contrôles positifs reconstitués peuvent être conservés à 2-8°C pendant 4 mois.
5. Equipements ou locaux spécifiques nécessaires (cf notice)	- étuve à 30°C - bain d'eau bouillante à 80°C
6. Réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer (cf notice)	Seuls les contrôles positifs sont à reconstituer.
7. Durée de formation de l'opérateur non initié à la méthode	Pour un opérateur formé aux techniques classiques de microbiologie, la formation à la technique ne nécessite aucune formation particulière.

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

Etapas	Temps moyen pour un échantillon (min)		Temps moyen pour 30 échantillon (min)	
	Norme	Alternative	Norme	Alternative
Préparation, pesée, dilution et broyage	7	7	90	90
Repiquage sur bouillons sélectif	1	1	20	20
Isolement du Fraser ½ et du Fraser sur géloses sélectives : Agar Listeria et autre milieu	2	/	30	/
Lectures et sélection des colonies à identifier	2	/	15	/
Réalisation du test OLRT	/	1	/	20
TOTAL (par échantillon)	12 minutes	9 minutes	5,2 minutes	4,3 minutes

Dans le cas d'échantillons positifs, il faut rajouter le temps nécessaire aux confirmations. Le temps moyen pour la confirmation d'une colonie suspecte à partir d'une gélose sélective a été estimé à environ 5 minutes.

Pour la méthode alternative, il faut ajouter le temps nécessaire à l'isolement sur gélose sélective, soit environ 1 minute par échantillon.

L'intérêt de la méthode alternative réside notamment dans la possibilité de trier les échantillons négatifs des échantillons suspects et d'alléger ainsi les confirmations, ainsi que dans le gain de temps technicien lorsqu'il s'agit d'analyser des séries d'échantillons.

9. Délai d'obtention des résultats

échantillons négatifs

Etape	Délai obtenu méthode OLRT	Délai obtenu méthode ISO 11290-1
Réalisation de l'enrichissement primaire	J0	J0
Ensemencements des différents bouillons d'enrichissement secondaire	J1	J1
Réalisation du test OLRT	J2	/
Isolement des bouillons sélectifs sur géloses sélectives	/	J1 & J3
Obtention des résultats négatifs		
- si aucune colonie caractéristique		J5
- si test OLRT négatif	J2	

échantillons positifs :

Etape	Délai obtenu méthode OLRT	Délai obtenu méthode ISO 11290-1
Réalisation de l'enrichissement primaire	J0	J0
Ensemencements des différents bouillons d'enrichissement secondaire	J1	J1
Réalisation du test OLRT et isolement sur géloses sélectives	J2	/
Isolement des bouillons sélectifs sur géloses sélectives	/	J1 & J3
Tests de confirmation :		
<u>Genre</u>		
- Isolement sur TSAYE, si nécessaire	J3	J2 à J5
- Gram, catalase	J3 à J4	J3 à J6
<u>Espèce</u>		
- Camp-test, hémolyse, bouillon TSBYE	J4	J3 à J6
- Utilisation des glucides	J4 à J5	J3 à J7
ou		
- réalisation d'une galerie	J3	J3 à J6
Obtention des résultats positifs		
<u>Genre :</u>		
- lecture des géloses OCLA	J3 à J4	
- tests de la méthode de référence	J3 à J4	J3 à J6
<u>Espèce</u>		
- après confirmation par les tests de la méthode de référence	J9 à J10	J9 à J11
- si utilisation de galeries miniaturisées	J4	J4 à J7

10. Type de qualification de l'opérateur	niveau identique à celui nécessaire pour la méthode de référence
11. Etapes communes avec la méthode de référence	étape d'enrichissement primaire en Fraser 1/2
12. Traçabilité des résultats d'analyse	/
13. Maintenance par le laboratoire	/

5 Conclusion

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

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.

Les performances de la méthode OLRT sont équivalentes à celles à la méthode de référence EN ISO 11290-1/A1 :2004. Elles ont été déterminées par l'analyse de 319 échantillons répartis dans cinq catégories de produits.

L'exactitude relative obtenue est de 98,1 %, la sensibilité relative de 96,6 % et la spécificité relative de 99,4 %, selon les calculs demandés par la norme EN ISO 16140.

6 résultats discordants ont été obtenus : 5 résultats faux négatifs et 1 résultat positif supplémentaire.

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 :

- 99,3% de sensibilité pour la méthode de référence
- 96,7% de sensibilité pour la méthode alternative.

Le niveau de détection relatif de la méthode OLRT 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 1,3 cellules de *Listeria* par 25 g ou mL d'échantillon et est identique à celui de la méthode de référence.

La spécificité de la méthode est bonne puisque toutes les souches de *Listeria* ont été détectées (inclusivité) à l'exception de *Listeria grayi* qui n'a pas été mise en évidence (fait partie des restrictions d'emploi), et aucune réaction croisée n'a été observée parmi les souches non *Listeria* testées (exclusivité).

Les résultats de **l'étude interlaboratoire** obtenus pour l'ensemble des 11 laboratoires retenus montrent que la méthode alternative et la méthode de référence ont des valeurs d'exactitude relative, de spécificité et de sensibilité équivalentes et du même ordre que celles obtenues lors de l'étude préliminaire.

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

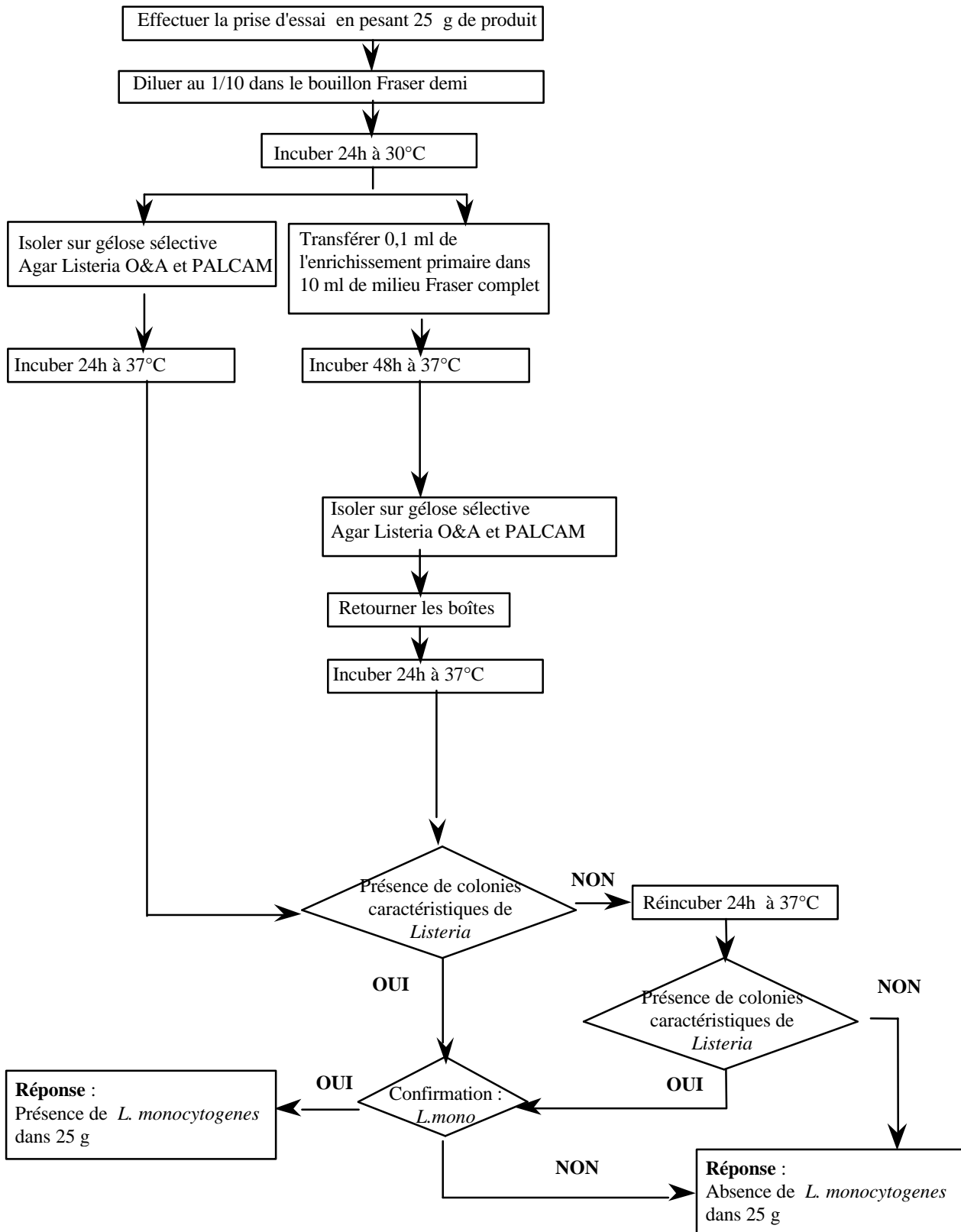
Compte-tenu de ces résultats, la validation de la méthode Oxoid *Listeria* Rapid Test (OLRT) a été reconduite en Juillet 2007, sous le numéro UNI 03/2-04/95.

ANNEXES

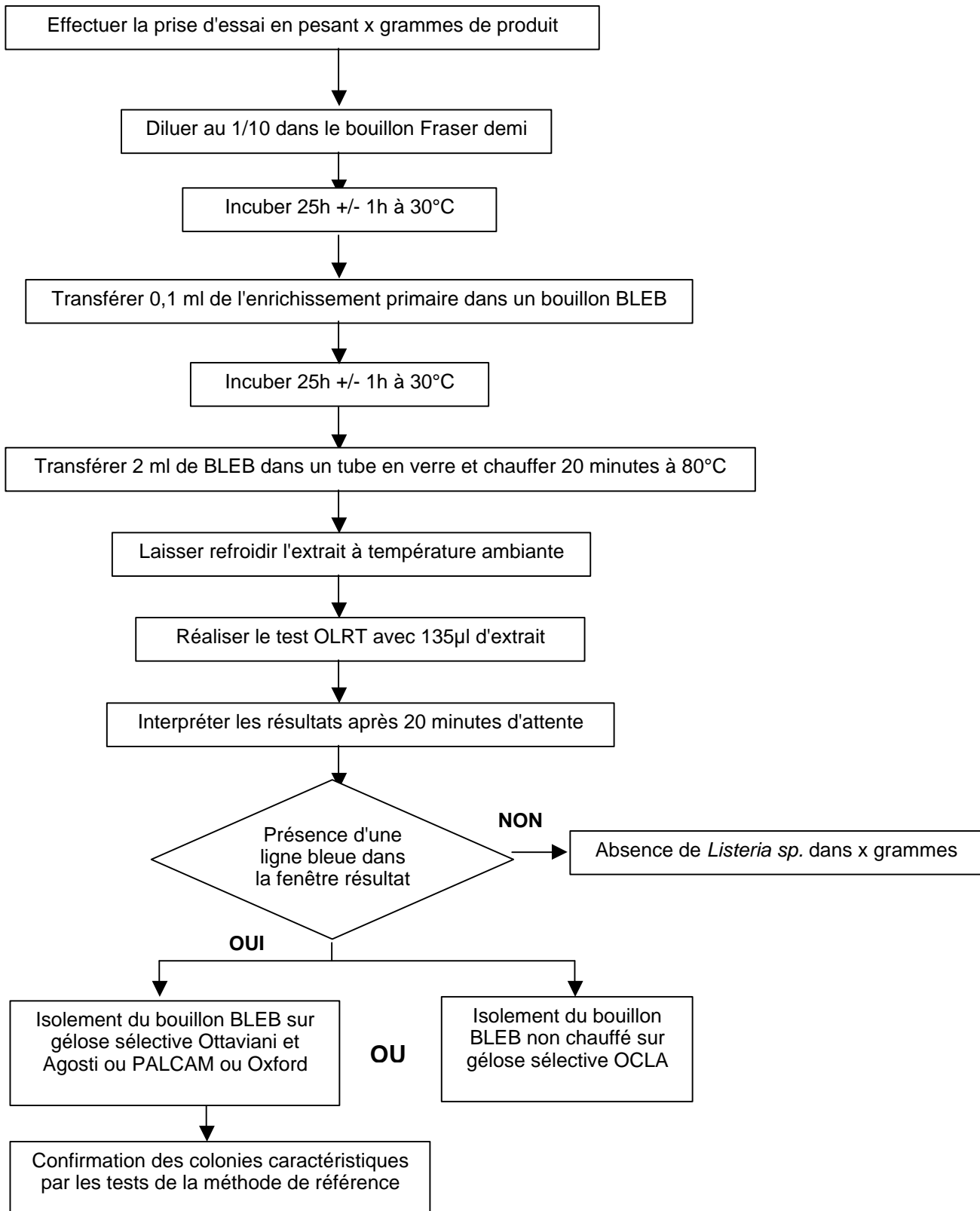
ANNEXE A :

PROTOCOLES ANALYTIQUES

NORME EN ISO 11290-1/A1 : 2004



METHODE OXOID *Listeria* Rapid Test (OLRT)



ANNEXE B :

RAPPEL HISTORIQUE DE LA VALIDATION

1 Rappel sur la méthode alternative

a. date de 1^{ère} Validation AFNOR et date(s) de reconduction

La méthode Oxoid *Listeria* Rapid Test est validée sous le numéro d'attestation UNI-03/2-04/95 :

- avril 1995 : validation initiale pour l'alimentation humaine
- avril 1999 : reconduction pour l'alimentation humaine
- juin 2003 : reconduction pour l'alimentation humaine, incluant une possibilité de confirmation des test positifs sur gélose OCLA

b. principaux résultats obtenus lors de la validation initiale et des éventuelles reconductions et extensions

Spécificité

Etude initiale 1995

50 souches de *Listeria* et 42 souches non *Listeria* ont été testées à partir de l'étape originale du protocole :

- ⇒ aucune réaction croisée n'a été observée
- ⇒ une souche de *Listeria grayi* n'a pas été mise en évidence (fait partie des restrictions d'emploi)

Limite de détection intrinsèque

Etude initiale 1995

Quatre souches de *Listeria* (*L.seeligeri* 1/2a, *L.monocytogenes* 4a, *L.monocytogenes* 1/2a, *L.innocua* 6b) ont été testées à des taux variant 10^2 à $3,5 \cdot 10^7$ cellules par mL.

Les différents essais ont permis de définir une sensibilité intrinsèque entre $5 \cdot 10^3$ et $9,5 \cdot 10^4$ cellules par mL de bouillon BLEB.

Limite de détection sur produits

Etude initiale 1995

Quatre souches de *Listeria* (*L.seeligeri* 1/2a, *L.monocytogenes* 4a, *L.monocytogenes* 1/2a, *L.innocua* 6b) ont été utilisées pour contaminer cinq matrices alimentaires (charcuterie crue, blanc de poulet, fromage au lait cru, poisson fumé, légumes crus), à différents niveaux de contamination, variant entre 1 et 750 cellules par 25 grammes :

- ⇒ les taux de contamination inférieurs à 10 par 25 grammes ont été détectés

Justesse

Etude initiale 1995

Au total 167 produits répartis dans les 4 catégories d'aliments ont été analysés en double par la méthode alternative et par la méthode de référence V08-055 : 81 produits étaient positifs, naturellement contaminés.

Deux produits ont été trouvés faux négatifs et un produit a été trouvé positif supplémentaire. La concordance entre la méthode alternative et la méthode V08-055 était de 98,2%.

Etude de reconduction 2003

Au total, 120 échantillons positifs répartis dans 4 catégories (produits carnés, produits laitiers, produits de la pêche et produits végétaux) ont été analysés en simple par la méthode alternative et par la méthode de référence NF EN ISO 11290-1 :1997.

Les résultats de trois échantillons étaient faux négatifs. Le pourcentage de concordance entre les deux méthodes est de 97,5 %.

Fidélité (essais interlaboratoires)

Etude de reconduction 1999

Dix laboratoires ont participé à l'étude collaborative et les résultats de 9 laboratoires ont été exploités suite à des problèmes de délai de réception. Chacun des laboratoires devait analyser deux échantillons d'un même niveau de contamination.

Etude de reconduction 2003

Onze laboratoires ont participé à l'étude collaborative et les résultats de 10 laboratoires ont été exploités suite à des problèmes de température à réception. Chacun des laboratoires devait analyser deux échantillons d'un même niveau de contamination.

Les pourcentages de résultats concordants par rapport à ceux attendus, obtenus pour les différentes études collaboratives, étaient les suivants :

Niveaux de contamination par 25 mL	Résultats négatifs	Résultats positifs
<u>Etude 1999</u>		
Niveau 0	100 % (18/18)	0 % (0/18)
Niveau 1 : 1 - 10 <i>Listeria</i> / 25 ml	0 % (0/18)	100 % (18/18)
Niveau 2 : 5 - 50 <i>Listeria</i> / 25 ml	0 % (0/18)	100 % (18/18)
Niveau 3 : 10 - 100 <i>Listeria</i> / 25 ml	0 % (0/18)	100 % (18/18)
<u>Etude 2003</u>		
Niveau 0	100 % (20/20)	0 % (0/20)
Niveau 1 : 1 - 10 <i>Listeria</i> / 25 ml	0 % (0/20)	100 % (20/20)
Niveau 2 : 5 - 50 <i>Listeria</i> / 25 ml	0 % (0/20)	100 % (20/20)
Niveau 3 : 10 - 100 <i>Listeria</i> / 25 ml	0 % (0/20)	100 % (20/20)

c. bilan des modifications intervenues dans la méthode alternative, ayant donné lieu ou non à une extension de validation

La seule modification apportée dans la méthode a eu lieu en 2003 et concerne les modalités de confirmation, avec la possibilité d'isoler le bouillon BLEB sur la gélose chromogène OCLA, à la place des géloses PALCAM ou Oxford, les colonies caractéristiques de *Listeria* étant ensuite identifiées par les tests classiques.

2 Etude bibliographique

La méthode étant validée par l'AOAC/RI, avec le numéro de certificat 96 07 01.

D'autre part, une évaluation indépendante a conduit à une reconnaissance EMMAS (European Microbiology Method Assessment Scheme) par deux organismes (CCFRA et LFRA) : la méthode OLRT a été comparée à la norme EN ISO 11290-1 :1996.

ANNEXE C :

ETUDE D'INCLUSIVITE / EXCLUSIVITE
-
TABLEAUX DE RESULTATS

Souche	Origine	Résultat du test
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Steak de bœuf	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Maroilles	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	Escalope de poulet	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	ATCC 35152	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	Langue de porc	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2b	SLCC 2755	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2c	Steak haché	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 3b	SLCC 2540	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 3c	SLCC 2479	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 4a	ATCC 19114	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	ATCC 19115	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	Salade	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 4d	ATCC 19117	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 4e	ATCC 19118	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 7	SLCC 2482	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	Poule	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	Pain de levure	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	Pommes à rissoler	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	Petit saucisson	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	Persil	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	Saucisson	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	Oignons	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	Rillettes	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	Pâté pimenté	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	Hareng fumé	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	Saucisson cuit	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	Environnement	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	Environnement	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2	Environnement	+
<i>Listeria innocua</i> 6a	ATCC 33090	+
<i>Listeria innocua</i> 6a	Chou	+
<i>Listeria innocua</i> 6a	Saucisse	+
<i>Listeria innocua</i> 6a	Levure	+
<i>Listeria innocua</i> 6a	Gésiers	+
<i>Listeria innocua</i> 6b	Environnement	+
<i>Listeria innocua</i> 6b	Steak haché	+
<i>Listeria innocua</i> non typable	Camembert	+
<i>Listeria innocua</i> non typable	Hareng fumé	+
<i>Listeria innocua</i> non typable	Saucisse	+
<i>Listeria innocua</i> non typable	Levure	+
<i>Listeria seeligeri</i> 1/2b	Langue de porc	+
<i>Listeria seeligeri</i> 1/2b	ATCC 35967	+
<i>Listeria seeligeri</i> 6b	Harengs	+
<i>Listeria welshimeri</i> 6b	ATCC 35897	+
<i>Listeria welshimeri</i> 6b	Steak haché	+
<i>Listeria welshimeri</i> 6b	Steak haché	+
<i>Listeria grayi</i>	ATCC 19120	-
<i>Listeria grayi</i>	ATCC 19120	-
<i>L.ivanovii</i>	ATCC 19119	+
<i>L.ivanovii</i>	Viande	+

Exclusivité

Etude	Souche	Résultat du test
Holbrook	<i>Bacillus licheniformis</i>	-
Holbrook	<i>Bacillus circulans</i>	-
Holbrook	<i>Bacillus macerans</i>	-
Holbrook	<i>Citrobacter koseri</i>	-
Holbrook	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-
Holbrook	<i>Enterobacter cloacae</i>	-
Holbrook	<i>Hafnia alvei</i>	-
Holbrook	<i>Proteus stuartii</i>	-
Holbrook	<i>Edwardsiella tarda</i>	-
Holbrook	<i>Azizona sp.</i>	-
Holbrook	<i>Aerococcus viridans</i>	-
IPL 1995	<i>Bacillus cereus</i>	-
IPL 1995	<i>Bacillus cereus</i>	-
IPL 1995	<i>Bacillus subtilis</i>	-
IPL 1995	<i>Bacillus megaterium</i>	-
IPL 1995	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	-
IPL 1996	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-
IPL 1995	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
IPL 1995	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
IPL 1995	<i>Streptococcus durans</i>	-
IPL 1995	<i>Streptococcus liquefaciens</i>	-
IPL 1995	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
IPL 1995	<i>Staphylococcus intermedius</i>	-
IPL 1995	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-
IPL 1995	<i>Rhodococcus equi</i>	-
IPL 1995	<i>Erysipelotrix rhusiopathiae</i>	-
IPL 1995	<i>Brochetrix rhusiopathiae</i>	-
IPL 1995	<i>Erysipelotrix campestris</i>	-
IPL 1995	<i>Brochetrix thermosphacta</i>	-
IPL 1995	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
IPL 1995	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
IPL 1995	<i>Xanthomonas maltophilia</i>	-
IPL 1995	<i>Comamonas acidovocans</i>	-
IPL 1995	<i>Citrobacter cloacae</i>	-
IPL 1995	<i>Citrobacter freundii</i>	-
IPL 1995	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
IPL 1995	<i>Providencia reetgeri</i>	-
IPL 1995	<i>Escherichia coli</i>	-
IPL 1995	<i>Salmonella Typhimurium</i>	-
IPL 1995	<i>Salmonella Enteritidis</i>	-
IPL 1995	<i>Acinetobacter anitravus</i>	-
IPL 1995	<i>Kurthia sp.</i>	-

ANNEXE D :

ETUDE COLLABORATIVE
DEGRE D'ACCORD

METHODE ALTERNATIVE

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 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
Moyenne :							1,00
Degré d'accord :							100%

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	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 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
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 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
Moyenne :							1,00
Degré d'accord :							100%

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 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
Moyenne :							1,00
Degré d'accord :							100%

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 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
Moyenne :							1,00
Degré d'accord :							100%

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 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
Moyenne :							1,00
Degré d'accord :							100%

ANNEXE E :

ETUDE COLLABORATIVE
CONCORDANCE

METHODE ALTERNATIVE

Nombre de laboratoires 11
 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	640	640
Laboratoire B	8	8	640	640
Laboratoire C	8	8	640	640
Laboratoire D	8	8	640	640
Laboratoire E	8	8	640	640
Laboratoire F	8	8	640	640
Laboratoire G	8	8	640	640
Laboratoire H	8	8	640	640
Laboratoire J	8	8	640	640
Laboratoire K	8	8	640	640
Laboratoire L	8	8	640	640
Total			7040	7040
Concordance	100,00%			

Nombre de laboratoires 11
 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	632	640
Laboratoire B	8	8	632	640
Laboratoire C	8	8	632	640
Laboratoire D	8	8	632	640
Laboratoire E	8	7	560	640
Laboratoire F	8	8	632	640
Laboratoire G	8	8	632	640
Laboratoire H	8	8	632	640
Laboratoire J	8	8	632	640
Laboratoire K	8	8	632	640
Laboratoire L	8	8	632	640
Total			6880	7040
Concordance	97,73%			

Nombre de laboratoires 11
 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	640	640
Laboratoire B	8	8	640	640
Laboratoire C	8	8	640	640
Laboratoire D	8	8	640	640
Laboratoire E	8	8	640	640
Laboratoire F	8	8	640	640
Laboratoire G	8	8	640	640
Laboratoire H	8	8	640	640
Laboratoire J	8	8	640	640
Laboratoire K	8	8	640	640
Laboratoire L	8	8	640	640
Total			7040	7040
Concordance	100,00%			

METHODE DE REFERENCE

Nombre de laboratoires 11
 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	640	640
Laboratoire B	8	8	640	640
Laboratoire C	8	8	640	640
Laboratoire D	8	8	640	640
Laboratoire E	8	8	640	640
Laboratoire F	8	8	640	640
Laboratoire G	8	8	640	640
Laboratoire H	8	8	640	640
Laboratoire J	8	8	640	640
Laboratoire K	8	8	640	640
Laboratoire L	8	8	640	640
Total			7040	7040
Concordance	100,00%			

Nombre de laboratoires 11
 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	640	640
Laboratoire B	8	8	640	640
Laboratoire C	8	8	640	640
Laboratoire D	8	8	640	640
Laboratoire E	8	8	640	640
Laboratoire F	8	8	640	640
Laboratoire G	8	8	640	640
Laboratoire H	8	8	640	640
Laboratoire J	8	8	640	640
Laboratoire K	8	8	640	640
Laboratoire L	8	8	640	640
Total			7040	7040
Concordance	100,00%			

Nombre de laboratoires 11
 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	640	640
Laboratoire B	8	8	640	640
Laboratoire C	8	8	640	640
Laboratoire D	8	8	640	640
Laboratoire E	8	8	640	640
Laboratoire F	8	8	640	640
Laboratoire G	8	8	640	640
Laboratoire H	8	8	640	640
Laboratoire J	8	8	640	640
Laboratoire K	8	8	640	640
Laboratoire L	8	8	640	640
Total			7040	7040
Concordance	100,00%			