

Rapport de synthèse du LNR-*Salmonella*

octobre 2009

Essai interlaboratoire d'aptitude (EIL V) mars/juin 2009:

**Détection de *Salmonella* dans les échantillons de
productions primaires selon les normes
NF U47-100:Juillet 2007, et NF U 47-100 adaptée
NF U 47-101 : novembre 2007 (dépistage)
NF U 47-102 : janvier 2008 (dépistage)**

Marylène BOHNERT, Gilles SALVAT

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AFSSA-Site de Ploufragan, unité HQPAP

Résumé : EIL – Détection des *Salmonella* : Résultats de la campagne 2009

Les résultats pris en compte sont ceux de 71 laboratoires accrédités ou en cours d'accréditation COFRAC Programme 116 pour la norme NF U47-100. La plupart ont été agréés ou reconnus par la DGAL. Leur liste a été publiée dans la note de service DGAL/SDPPST/N2009-8058 en date du 11 février 2009. La version de la norme NF U47-100 est celle de juillet 2007, avec les options des géloses d'isolement propres à chaque participant. Le protocole de la norme «NF U47-100 adaptée» est inclus dans la précédente.

La matrice échantillon est constituée de fientes provenant de l'élevage EOPS de l'Afssa site de Ploufragan (LERAPP). Les échantillons sont congelés deux fois, la première avant envoi et la deuxième avant analyse dans les laboratoires participants. Les échantillons tests sont individuellement et artificiellement contaminés par une souche de *Salmonella* (SE) contenue dans un matériel de référence (une lenticule) par les participants.

Quinze échantillons-tests répartis en 3 niveaux de contamination, 5 "blanc", 5 "intermédiaire" et 5 "fort" sont testés par les participants. Six contrôles sont inclus, quatre constitués uniquement par une lenticule dissoute dans l'EPT (2 blancs et 2 *Salmonella* Enteritidis au niveau intermédiaire), un négatif constitué par les milieux nonensemencés et un négatif constitué uniquement de matières fécales.

Le matériel de référence est testé par le fabricant pour l'homogénéité des lots. La stabilité des lenticules est assurée jusqu'à la date d'expiration des lots. Ce matériel présente l'avantage de pouvoir être transporté quelques jours à température ambiante et de mettre à disposition des participants un faible nombre de *Salmonella* de façon fiable.

La flore annexe - entérobactéries à 37°C et micro-organismes à 30°C - est dénombrée par l'organisateur dans des conditions similaires du jour de l'envoi et du début des analyses.

Les critères de performance appliqués dans cet EILA sont ceux utilisés par le LCR-*Salmonella* dans sa campagne de mars 2008. Neuf laboratoires ont analysé des échantillons supplémentaires. Tous satisfont aux critères de performance.

Liste des abréviations

COFRAC	comité français d'accréditation
DGAL	Direction Générale de l'Alimentation
EIL et EILA	essai inter-laboratoire et essai inter-laboratoire d'aptitude
EPT	eau peptonée tamponnée
HPA	Health Protection Agency
LCR- <i>Salmonella</i>	laboratoire communautaire de référence pour les salmonelles
LNR - France	laboratoire national de référence pour les salmonelles (France)
MKTT(n)	bouillon au tétrathionate (Müller-Kauffmann) - composition de la norme NF U47-100:Juillet 2007 au paragraphe B.4.
MSRV	milieu semi-solide de Rappaport-Vassiliadis - composition de la norme NF U47-100:Juillet 2007 au paragraphe B.3.
PCA	gélose de dénombrement (plat count agar)
SE	souche de <i>Salmonella</i> Enteritidis
STM	souche de <i>Salmonella</i> Typhimurium
TS	eau peptonée salée ou tryptone sel
TSA	gélose tryptone soja
XLD	gélose au xylose, lysine désoxycholate
XLT4	gélose xylose, lysine, tergitol 4

1 Introduction

Selon la réglementation européenne ^{1 & 2 & 3} la Commission Européenne et les autorités de chaque pays disposent pour les salmonelles d'un réseau constitué d'un laboratoire communautaire de référence (LCR-*Salmonella*), de laboratoires nationaux de référence (LNR) et de laboratoires officiels.

En France, les laboratoires officiels qui réalisent les analyses définies dans les plans de lutte des *Salmonella* ^{4 & 5 & 6} doivent être soit agréés soit reconnus. Ils doivent participer à l'EILA qu'organise le LNR à leur intention.

Suite aux appels à candidature des notes de service DGAL/SDPPST/N2008-8240 datée du 17 septembre 2008 et DGAL/SDPPST/N2009-8034 datée du 22 janvier 2009, la liste des laboratoires agréés et reconnus a été publiée dans la note de service DGAL/SDPPST/N2009-8058 en date du 11 février 2009 ⁷.

De plus, quelques laboratoires, qui désirent être accrédités par le COFRAC ont aussi participé à cet EILA. L'accréditation par le COFRAC est l'étape préalable pour qu'un laboratoire puisse être agréé ou reconnu.

Le but de ces comparaisons inter-laboratoires est d'évaluer la performance d'un laboratoire et de la surveiller au cours du temps.

De plus la synthèse des résultats de l'ensemble des laboratoires permet de calculer des données de caractérisation de la méthode, ici la NF U47-100 dans son intégralité et pour la voie MSRV (protocole appelé "variante à la méthode NF U 47-100" dans l'arrêté du 30 décembre 2008 référencé dans la note 6, ou dénommée "NF U 47-100 adaptée" dans la note de service DGAL/SDSSA/N2009-8031 du 21 janvier 2009 et référencée sous cette appellation par le COFRAC).

Cet essai interlaboratoire vient compléter les précédents EIL de 2004, 2005, 2007 et 2008. L'historique est donné en Annexe 7.

¹ Directive 2003/99/CE du Parlement européen et du Conseil du 17 novembre 2003 sur la surveillance des zoonoses et des agents zoonotiques, modifiant la décision 90/424/CEE du Conseil et abrogeant la directive 92/117/CEE du Conseil

² Règlement (CE) N° 2160/2003 du Parlement européen et du Conseil du 17 novembre 2003 sur le contrôle des salmonelles et d'autres agents zoonotiques spécifiques présents dans la chaîne alimentaire

³ Règlement (CE) N°882/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif aux contrôles effectués pour s'assurer de la conformité avec la législation sur les aliments pour animaux et les denrées alimentaires et avec les dispositions relatives à la santé et au bien-être des animaux

⁴ Arrêté du 26 février 2008 relatif à la lutte contre les infections à *salmonella* dans les troupeaux de reproduction de l'espèce *Gallus gallus* en filière chair et fixant les modalités de déclaration des salmonelloses aviaires, visées à l'article D.223-1 du code rural, dans ces mêmes troupeaux (JORF N° 0055)

Arrêté du 30 décembre 2008 modifiant l'arrêté du 26 février 2008 relatif à la lutte contre les infections à *salmonella* dans les troupeaux de l'espèce *Gallus gallus* en filière chair et fixant les modalités de déclaration des salmonelloses aviaires, visées à l'article D.223-1 du code rural, dans ces mêmes troupeaux (JORF du 3 janvier 2009)

⁵ Arrêté du 30 décembre 2008 relatif à la lutte contre les infections à *salmonella* dans les troupeaux de poulet de chair mentionnée à l'article D.223-21 du code rural et fixant les modalités de déclaration des salmonelloses aviaires, visées à l'article D.223-1 du code rural (JORF du 11 janvier 2009)

⁶ Arrêté du 26 février 2008 relatif à la lutte contre les infections à *salmonella* dans les troupeaux de l'espèce *Gallus gallus* en filière ponte d'œufs de consommation et fixant les modalités de déclaration des salmonelloses aviaires, visées à l'article D.223-1 du code rural, dans ces mêmes troupeaux (JORF N° 0055)

Arrêté du 30 décembre 2008 modifiant l'arrêté du 26 février 2008 relatif à la lutte contre les infections à *salmonella* dans les troupeaux de l'espèce *Gallus gallus* en filière ponte d'œufs de consommation et fixant les modalités de déclaration des salmonelloses aviaires, visées à l'article D.223-1 du code rural, dans ces mêmes troupeaux (JORF du 3 janvier 2009)

⁷ Note de Service DGAL / SDPPST / N2009-8058 du 11 février 2009 – Laboratoires agréés et reconnus pour les analyses de salmonelles dans les troupeaux de volailles

2 Organisation et Conception, Matériels et Méthodes

2.1 Participants, code des laboratoires et confidentialité, calendrier, diffusion des instructions aux participants, code des échantillons, emballage, transport

Le 28 janvier 2009 le LNR a envoyé aux participants potentiels :

laboratoires ayant participé aux précédents EILA,

laboratoires en cours d'accréditation, ayant contacté le LNR,

par courriel et courrier postal : une lettre d'annonce de l'EILA [Annexe 1] accompagné de l'agenda [Annexe 2 et 2bis], et uniquement par courrier postal, les deux documents personnalisés, la fiche d'inscription à l'EIL [Annexe 3] et le devis.

Les codes attribués au hasard à chaque participant en utilisant la fonction ALEA du logiciel EXCEL sont Lab01 à Lab74 pour les échantillons envoyés en février ; les codes Lab75 à Lab 84 correspondent aux échantillons envoyés le 13 mai et le 19 juin 2009.

Un ou plusieurs colis d'échantillons ont été envoyés à 73 laboratoires. Onze laboratoires étaient inscrits pour la première fois.

Un laboratoire n'a pas pu faire les analyses. La liste des 72 participants ayant rendu des résultats, est donnée en [Annexe 4]. Deux participants ont souhaité refaire les analyses sur de nouveaux échantillons, et un laboratoire a utilisé des milieux et des protocoles différents ; les résultats ne sont pas inclus dans ce rapport car ils ne peuvent pas être comparés à ceux de la norme NF U 47-100. Ce laboratoire est accrédité COFRAC programme 116 pour la recherche de *Salmonella* mais seulement pour la norme NF U47-102. Un laboratoire n'a participé qu'à partir de juin. Ce nouveau participant a réalisé les analyses du 22 au 30 juin 2009. Ses résultats sont inclus dans ce document.

Aussi les codes Lab21, Lab24, Lab32 et Lab50 n'existent pas dans ce rapport. Les résultats de 71 participants sont présentés dans ce rapport.

Les échanges entre l'organisateur et les participants se sont faits surtout par courriel. Pour cet essai, chaque laboratoire a donné une ou plusieurs adresses électroniques.

La confidentialité est assurée par l'organisateur : une seule personne crée et a accès aux documents des laboratoires, aux codes des échantillons et assure l'exploitation y compris informatique des résultats.

Les premiers colis sont préparés et envoyés le lundi 16 et le mardi 17 février. Chaque paquet contient le sac de fientes placé dans un pot prélèvement lui-même sur-emballé dans un sac plastique, et le sac contenant les tubes de lenticules placé dans un emballage spécifique SODIBOX (sachet étanche pour les échantillons de catégorie B n°ONU 3373). Le transport est assuré par courrier rapide, à température ambiante. Pour chacun des participants, les tubes contenant une lenticule destinée aux échantillons-tests, sont codifiés par les chiffres de 1 à 15 incluant les 3 niveaux de contamination (négatif, intermédiaire, fort). Ceux destinés aux contrôles positifs et négatifs sont codifiés C1 à C4. Les laboratoires analysent des échantillons avec des codes différents attribués au hasard. De cette manière la collusion entre les laboratoires est impossible.

Au cours de la semaine 8, la diffusion du protocole [Annexe 5] et de l'agenda corrigé (version 2) n'a été effective qu'après la suppression d'un fichier joint trop lourd (scan de la notice technique des lenticules).

Le formulaire Excel du "rapport individuel de laboratoire" [Annexe 6] a été diffusé le 20 février.

Chaque participant a déjà reçu le décodage individuels de ses résultats en mars ou avril, et le 13 mai par courriel le rapport intermédiaire présentant les résultats de l'ensemble des participants ; il permet l'inter-comparaison.

L'organisateur a contacté individuellement les laboratoires qui avaient des résultats sous ou en limite des critères de performances pour leur proposer de réaliser une autre série d'analyses (voir le paragraphe 2.4). Dans un premier temps des causes potentielles d'écart ont été évoquées.

Les colis pour les neuf laboratoires qui ont analysé des échantillons supplémentaires ont été préparés et envoyés le 13 mai 2009. L'organisateur a donné le décodage quelques jours après la réception des résultats en mai et juin. Cette étape est terminée depuis le 17 juin.

Puis un nouvel participant s'est joint à cette campagne ; le colis d'échantillons a été envoyé le 19 juin.

Les participants à la 2^{ème} session ont reçu individuellement leurs résultats retenus pour cette campagne sous la forme d'un "rapport de laboratoire", synthèse de ceux de la première et de la 2^{ème} session.

De plus, un complément au rapport intermédiaire a été envoyé par courriel le 1^{er} juillet à tous les participants. Il présente l'ensemble des résultats retenus à la suite des deux sessions (voir le paragraphe 3.3.4).

2.2 Méthode de recherche des *Salmonella* et instructions particulières données aux participants = le protocole

La méthode de recherche imposée est celle qui est listée dans le programme 116 d'accréditation du COFRAC, la norme **NF U 47-100: juillet 2007**⁸. D'autres matrices qui ne sont pas dans le domaine d'application de la NF U 47-100, peuvent être analysées par un protocole identique en application du dépistage décrit dans les normes NF U 47-101:novembre 2007 et NF U 47-102:janvier 2008.

Il est demandé à chaque participant d'utiliser lors de cet EIL le même protocole que lors des analyses de contrôles.

Les résultats détaillés concernant la voie MSR/V sont demandés dans le rapport. Ainsi la performance des laboratoires pour la norme « NF U 47-100 adaptée » est possible.

Les modalités de préparation de la suspension-mère, de revivification des *Salmonella* des lenticules, et de contamination sont décrites dans le document intitulé «Essai interlaboratoire 2009 pour la détection des *Salmonella* - Protocole» envoyé seulement par courriel [Annexe 5].

Le formulaire de rendu des résultats est un fichier Excel spécifique à cet EILA [Annexe 6]; il a uniquement été transmis par courriel. Il comporte un questionnaire avec des réponses "fermées" sur la nature et les références des milieux utilisés.

2.3 Nature des Echantillons soumis à essai

2.3.1 Choix d'une souche de *Salmonella* et des niveaux de contamination

Une seule souche de *Salmonella* a été choisie pour contaminer à trois niveaux les échantillons-tests. Le choix de plusieurs souches impliquerait un trop grand nombre d'échantillons à analyser et n'est pas envisagé pour l'EIL 2009.

Le sérovar choisi – Enteritidis – est l'un des sérovars visés par la réglementation en cours en 2009 dans la filière avicole pour l'espèce *Gallus gallus*. Le choix lors des EILA précédents s'était porté sur Typhimurium puis Enteritidis [cf l'historique en Annexe 7].

Les deux niveaux de contamination intermédiaire et fort sont alignés sur l'EIL organisé par le LCR-*Salmonella* en 2008 pour ce sérovar ; soit environ 10 SE et 100 SE pour 10 g de fiente. Le niveau intermédiaire devrait se situer au seuil de détection de la méthode pour ce type de matrice.

Les contrôles positifs sont constitués de lenticules en l'absence de matrice. Aussi le niveau le plus bas est choisi. Les deux lenticules (SE-10) permettent de valider les bonnes conditions d'analyse des échantillons-tests.

2.3.2 Matériels de référence, homogénéité et stabilité

Le fabricant des lenticules, Health Protection Agency (HPA), fournit des documents qualité pour chaque lot reçu : (1) une fiche de sécurité, (2) une notice d'utilisation, (3) une fiche donnant les résultats des contrôles d'homogénéité (voir le paragraphe 3.3.1 « Résultats »).

La stabilité en conservation à $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ est garantie jusqu'à la date limite d'utilisation des lots (*i.e.* juillet 2009 et avril 2010). La nature et le conditionnement des lenticules permettent leur transport à température ambiante pendant quelques jours.

Lors des essais avec ce matériel⁹, le LCR-*Salmonella* a jugé satisfaisante l'usage des lenticules comme matériel de référence.

⁸ Anonyme, AFNOR, NF U 47-100 : Juillet 2007. Méthodes d'analyse en santé animale – Recherche par l'isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles dans l'environnement des productions animales.

⁹ C. Veenman and K.A. Mooijman. The use of lenticules as alternative reference materials for capsules. Newsletter . Community Reference laboratory for *Salmonella* . Vol.11 NO.4 December 2005.

2.3.3 Echantillons (Matrice): fientes

La matrice fiente est choisie pour sa flore de compétition particulièrement importante ; ce qui rend plus difficile la détection des *Salmonella*. Pour cet EILA, les fientes sont pures ; elles ne sont pas mélangées à un milieu de transport contrairement aux précédents EIL.

Environ 18 kg de fientes ont été collectées le 2 février 2009 dans l'élevage protégé en isolateur de poules EOPS (exempts d'organismes pathogènes spécifiés) de l'Afssa-Ploufragan. Des contrôles mensuels assurent de l'absence des principaux pathogènes aviaires ainsi que celle de *Salmonella*.

Pour assurer une meilleure homogénéité, les fientes sont mélangées au fouet puis distribuées en sacs à raison d'au moins 230 g par unité. Le sac est soudé, mis dans une chaussette en jersey tubulaire et emballé dans un pot à prélèvement, couvercle fermé. Le stockage est réalisé sous congélation jusqu'à l'envoi.

Cette préparation des sacs de fientes est effectuée les 2 et 3 février, deux semaines avant la date d'envoi. Pour les échantillons envoyés en mai et juin, 3 kg de fientes de dindes EOPS ont été collectées le 11 mai et la préparation des sacs d'environ 350 g a été faite dans la journée.

L'absence de *Salmonella* dans les fientes collectées en février est contrôlée sur 10 échantillons de fientes de 10 g, après une seule congélation, le vendredi 13 février. La norme NF U47-100 est suivie. L'absence de migration sur MSR/V est contrôlée et/ou l'absence de colonies caractéristiques de *Salmonella* sur les géloses d'isolement XLD et Rambach est vérifiée. Pour les fientes collectées en mai, les résultats des prélèvements d'autocontrôle réalisés le même jour sont pris en compte.

La flore annexe est déterminée dans des conditions simulant l'état au moment de l'envoi (condition A) et au début des analyses après un transport de 1 ou 2 jours (condition B' ou B) ou de 3 jours (condition C). Les dénombrements de la flore aérobie mésophile et d'entérobactéries sont effectués sur un échantillon pour chaque condition A, B et C. Les colonies sont obtenues sur géloses PCA incubées à 30°C (norme ISO 4833 modifiée : 2 boîtes par dilution, étalement en surface) et sur VRBG incubées à 37°C (norme ISO 21528 modifiée : 2 boîtes par dilution, sans confirmation des colonies).

2.3.4 Echantillons tests

Trois niveaux de contamination (négatif, intermédiaire et fort) et 5 répétitions par niveau sont choisis pour la première session (analyses en mars et avril). En l'absence de référentiel normalisé spécifique pour l'organisation d'un tel EIL, cette option adoptée par le LCR-*Salmonella* est retenue^{10 & 11}. Elle permet de juger des performances des laboratoires.

De même le seuil de sensibilité de la norme NF U 47-100 n'étant pas connue, les 2 niveaux positifs de contamination sont choisis identiques à ceux des essais interlaboratoires organisés par le LCR-*Salmonella*. Ces niveaux peuvent être rencontrés dans les prélèvements d'élevages.

Les niveaux visés - au moment du début des analyses par les participants - sont de 100 et de 10 *Salmonella* Enteritidis par prise d'essai de 10 grammes de fiente respectivement pour les niveaux «fort» et «intermédiaire».

La contamination par *Salmonella* est réalisée individuellement, par ajout d'une lenticule après une phase de revivification. Le protocole de contamination de la matrice tient compte des modalités testées par le LCR-*Salmonella*⁹.

¹⁰ Berk, P.A., Veenman, C. and Mooijman, K.A. EU Interlaboratory comparison study IX (2005) on bacteriological detection of *Salmonella* spp. - National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands. Report no.: 330300 011/ 2006.

¹¹ Kuijpers A.F.A., Veenmann C., Mooijman K.A. EU Interlaboratory comparison study veterinary - X (2006) - Bacteriological detection of *Salmonella* in pig faeces. National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands. Report no.: 330604004/ 2007.

2.4 Echantillons supplémentaires testés = 2^{ème} session

L'organisateur a listé les participants pour lesquels les résultats des analyses de mars –avril ne satisfaisaient pas à un ou plusieurs critères de performance. Ces laboratoires ont été contactés individuellement ; des causes potentielles des écarts ont été évoquées. Ces participants ont analysés un nombre variable d'échantillons, en fonction des écarts observés. Ils ont choisi de refaire uniquement les analyses selon la méthode pour laquelle des écarts étaient observés ou systématiquement les deux méthodes.

Nombre d'échantillons supplémentaires analysés

nbre	contrôle lenticule SE-10		contrôle lenticule blanc		Echantillon –test 10g fiente + SE100		Echantillon –test 10g fiente + SE10		Echantillon –test 10g fiente + blanc	
	NF U 47-100	MSRV	NF U 47-100	MSRV	NF U 47-100	MSRV	NF U 47-100	MSRV	NF U 47-100	MSRV
Lab 05					5	5	5	5	2	2
Lab 14						5		5		2
Lab 23					5	5			2	2
Lab 27						5		5		2
Lab 33						5		5		2
Lab 38	2	2	2	2	5	5	5	5	2	2
Lab 49		2		2			5	5	2	2
Lab 64							5	5	2	2
Lab 68							5	5	2	2

Cependant, le Labo 69 présente un écart uniquement pour le niveau fort (SE-100), alors que les 5 réplicats du niveau intermédiaire (SE-10) ont été détectés. L'organisateur n'a pas repéré cet écart en faisant le bilan des résultats de mars-avril et n'a pas proposé d'effectuer une 2^{ème} série d'analyse.

2.5 Traitement des données et analyses statistiques

En l'absence de texte de référence pour l'organisation d'EILA sur des méthodes qualitatives, les choix suivants ont été faits.

- Les résultats des participants sont présentés sous forme de graphiques, permettant à chacun de se situer.
- De plus les résultats obtenus par l'ensemble des laboratoires permettent de calculer les caractéristiques de performance de la norme NF U47-100 pour le type d'échantillon analysé (sérovat et matrice) :

► le taux de faux positifs et la spécificité pour les échantillons non contaminés (niveau "blanc").

La spécificité est la capacité de la méthode à donner une réponse négative pour un échantillon dont on a démontré qu'il ne contient pas le germe cible.

$$\text{Pourcentage de spécificité} = \left[1 - \frac{\text{nombre de faux positifs}}{\text{nombre total de résultats au niveau "blanc"}} \right] \times 100\%$$

(selon la norme EN ISO 16140 et adapté au cas de l'évaluation d'une seule méthode rapporté par Lombard B. thèse 2004) ¹².

► le % d'échantillons détectés (sensibilité), par niveau de contamination (10 et 100).

La sensibilité est la capacité de la méthode à donner une réponse positive pour un échantillon dont on sait qu'il contient le germe cible. Le pourcentage de sensibilité *SE* est calculé comme suit ¹²

$$\text{Pourcentage de sensibilité} = \frac{\text{Nombre de résultats positifs à un niveau de contamination donné}}{\text{Nombre de résultats obtenus à ce même niveau}} \times 100\%$$

¹² LOMBARD B. (2004). Les essais inter-laboratoires en microbiologie des aliments. Thèse de doctorat. Département Sciences pour les Industries Biologiques et Alimentaires, INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON, soutenue le 13 décembre 2004.

► la justesse pour l'ensemble des résultats.

$$\text{Pourcentage de justesse} = \frac{\text{Nombre de résultats corrects(positifset négatifs)}}{\text{Nombre total d'échantillons (positifset négatifs)}} \times 100\%$$

Les protocoles de la norme NF U 47-100 inclut celui de la norme "NF U 47-100-adaptée" (identique à la norme internationale NF EN ISO 6579/A1: Oct 2007). Les résultats obtenus par les deux protocoles sont comparés.

2.6 Critères de performance des laboratoires

Ces critères retenus pour statuer de la performance des laboratoires français participant à cet EILA pour la norme NF U 47-100 et NF U 47-100-adaptée (voie MSRV seule) sont ceux du LCR proposés lors de l'essai XI de 2008 ¹³ pour les laboratoires nationaux de référence. Cependant, il doit être souligné que le lot de gélule SE-10 utilisé avait une moyenne de 9 puis de 7 lors des deux contrôles de novembre 2007 puis de mars 2008.

Critères pour les échantillons contrôles:		résultat au minimum
	% de positif	Nbre d'échantillons parmi le nbre analysés
SE 10	50 %	1 « positif » sur 2 analysés
blanc	0 %	2 « négatif » sur 2 analysés

Pour les échantillons-tests les critères sont définis en fonction de la performance de la méthode.

Un critère est défini au seuil de détection. C'est le niveau de contamination pour lequel la méthode détecte la présence de *Salmonella* dans 50% des analyses. Un autre critère est défini pour le niveau de contamination «fort» qui est fixé dans les essais interlaboratoires à 10 fois le niveau de contamination correspondant au seuil de détection. Il correspond au maximum de détection de la méthode, idéalement 100%.

Le seuil de détection des *Salmonella* de la norme ISO et AFNOR dépend du sérovar et de la matrice. Le LCR-*Salmonella* a estimé qu'il est de 10 – 20 *S. Enteritidis* dans 10 g de fientes. C'est le niveau dit « intermédiaire » de cet EIL.

Critères pour les échantillons tests:		résultat au minimum
échantillon-test (lenticule + fiente)	% de positif	Nbre de positif parmi le nbre analysé
blanc ⁽¹⁴⁾	0 % ⁽¹⁾	1 « positif » toléré sur 5 analysés ⁽¹⁾
SE-100	80 %	4 « positif » sur 5 analysés
SE-10 ⁽¹⁵⁾	20 %	1 « positif » sur 5 analysés

3 Résultats

3.1 Transport

Les durées de transport sont prises en compte pour juger du bon état des échantillons, une des conditions des résultats des analyses.

Dans le tableau suivant les délais de transport des 80 colis correspondant aux résultats pris en compte dans

¹³ Kuijpers A.F.A., Mooijman K.A. Interim summary report CRL-Salmonella - Interlaboratory Comparison study veterinary XI (2008) on Bacteriological detection of Salmonella in chicken faeces. National Institute for Public Health and the Environment (RIVM / LZO), Bilthoven, The Netherlands.

¹⁴ Tous les résultats devraient être négatifs. Mais comme il n'est pas possible de garantir à 100% l'absence de contamination de la matrice en *Salmonella*, 1 résultat positif sur les 5 échantillons est toléré

¹⁵ Malencontreusement, dans le formulaire de rendu des résultats, le critère pour les 5 échantillons tests contaminés avec SE-10 est celui appliqué de 2005 à 2007. Il n'a pas été modifié lors de l'actualisation du formulaire en 2009. C'est aussi celui appliqué dans l'EIL 2009 du LCR pour les niveaux faibles *S. Typhimurium* (5) et pour *S. Enteritidis* (20).

cette campagne d'EIL. La majorité des laboratoires réceptionnent le colis après deux jours de transport. Malgré la durée de transport plus longue (4 jours), les résultats du Lab 51 sont pris en compte ; ils correspondent à ceux attendus.

Durée du transport	1 jour	2 jours	3 jours	4 jours	inconnu
Nombre de colis	7	64	6	1	2

Etat du colis à réception	Nombre sur le total de 80
bon état	80

Etat du sac de fiente à réception	Nbre de colis
bon état	62
fuite du sac limitée dans le pot en plastique, chaussette salie cas particuliers : 1 sac de fiente réceptionné ouvert 1 sac était gonflé et les fientes étaient présentes au niveau de l'ouverture	18

Les conditions d'acheminement des fientes n'étaient pas satisfaisantes lors des précédents EIL. En 2008, elles étaient conditionnées directement dans un pot en plastique placé dans un sac plastique ; et dans 50 cas pour les 63 envois des fientes dans le sac plastique de protection étaient enregistrées.

Les fientes conditionnées en sac présentent moins de fuites.

3.2 Planning

Le planning [annexe 2] a été respecté jusqu'au 13 mai, date de l'envoi du rapport intermédiaire et des échantillons supplémentaires pour neuf participants.

3.3 Echantillons soumis à essai

3.3.1 Les lenticules

Présentation, utilisation

Etat des tubes de lenticules et état des lenticules après ouverture du tube	Nbre d'envois	Type de lenticule	code du labo	conséquence
tubes intacts et après ouverture, lenticules présentes et intactes	79			
tube intact mais 1 lenticule placée sur le coté du filtre et cassée	1	SE 100	Lab 42	résultats pris en compte

Le Lab09 a signalé une erreur de manipulation lors de la revivification des lenticules. Un seul échantillon-contrôle SE10 a pu être analysé. Au vu de l'ensemble des résultats du Lab09, des analyses supplémentaires n'ont pas été jugées nécessaires.

La préparation des lenticules diffère légèrement des modalités de la notice technique fournie par le fabricant HPA. Elle reprend les conditions du test de comparaison Lenticules vs Capsules préparées par le LCR-*Salmonella*⁹.

Les modalités de dissolution des lenticules, de revivification et de contamination des échantillons sont décrites dans le protocole [Annexe 5]. Ces modalités sont particulières aux matériels de référence et diffèrent complètement de la préparation habituelle des échantillons que les participants contrôlent en

routine. La phase de revivification des lenticules est nécessaire car les *Salmonella* stressées peuvent présenter une longue phase de latence et leur croissance peut être rapidement stoppée en présence d'une flore compétitive physiologiquement active.

Une des causes des analyses supplémentaires est le manque de phase de revivification.

Homogénéité

Lors des essais avec ce matériel ⁹, le LCR-*Salmonella* a jugé satisfaisante l'homogénéité des lots de lenticules (calcul du facteur T₂).

Les données du certificat de contrôle permettent de caractériser l'homogénéité des lots de lenticules.

Pour chaque lot, 30 lenticules sont testées par le fabricant Health Protection Agency

<i>Salmonella</i>	N° de lot	date du contrôle [date d'expiration]	moyenne du nombre de <i>Salmonella</i> par lenticule sur gélose Columbia+sang (sur gélose PCA)	Etendue ou amplitude	95% IC	99% IC	utilisé 1 ^{er} envoi (fév) / 2 ^e (mai-juin)
blanc	000-090114 000-070117	/	/	/	/	/	1 ^{er} & 2 ^e
<i>S. Enteritidis</i> NCTC 6676	214-080520	5/06/2008 [juillet 2009]	113 (86)	89 - 158 (62 - 100)	/	/	1 ^{er} & 2 ^e
<i>S. Enteritidis</i> NCTC 6676	214-080522	5/06/2008 [juillet 2009]	17 (12)	8 - 26 (5 - 20)	/	/	1 ^{er}
<i>S. Enteritidis</i> NCTC 6676	214-080522	17/02/2009 [avril 2010]	15 (10)	8 - 23 (5 - 17)	8 - 23 (4 - 17)	6 - 25 (3 - 19)	2 ^e

Remarque : dans un lot, le nombre de *Salmonella* par lenticule est variable. Comme cette variation peut être modélisée par la loi de Poisson, la probabilité qu'une lenticule provenant d'un lot de moyenne 10 ne contienne aucune *Salmonella* est de $p(0) = e^{-10} \times \frac{10^0}{0!} = 4.54 \times 10^{-5} \times \frac{1}{1} \approx 5 \times 10^{-5}$.

3.3.2 Matrice fiente : absence de *Salmonella* et dénombrement de la flore annexe

Contrôle de l'absence de *Salmonella* dans les fientes

Les fientes prélevées pour l'essai sont issues des élevages eops (exempts d'organismes pathogènes spécifiques) de l'Afssa-Ploufragan, pour lesquels une surveillance régulière est mise en œuvre. L'absence de *Salmonella* est confirmée pour les 10 prises d'essai de 10 g de fientes collectées en février. Il est à noter que lors de la lecture des géloses d'isolement, pour uniquement un des 10 échantillons, des colonies caractéristiques étaient présentes sur la gélose XLD. De même, la gélose Rambach présentait des colonies de couleur typique, rose fuschia mais de plus petites tailles que les colonies typiques de *Salmonella*. Une souche de *Citrobacter freundii* a été identifiée par utilisation de galerie API 20^E.

Tous les échantillons des autocontrôles du troupeau de dindes dans lequel les fientes ont été collectées en mai, sont négatifs.

De plus toutes les analyses des échantillons-contrôles «fientes» (CF 5) par les participants, -toutes négatives- confortent la validation de la matrice comme exempte de *Salmonella*.

Les résultats des dénombrements de la flore annexe

Après avoir été congelées deux fois, les fientes de dindes semblent contenir plus d'entérobactéries que celles de poulet. Mais la durée de conservation en congélation n'est que d'une journée pour les fientes de dindes contre un mois pour celles de poulets (voir les 2 tableaux ci-après).

Fientes de poules collectées le 2 février 2009

Conditions A ou B ou C 1 prise d'essai testée par sac de fiente – 2 sacs testés	Microorganismes à 30°C UFC		Entérobactéries à 37°C UFC	
A : une seule congélation ⇒ une décongélation le jour de l'analyse	1.6 × 10 ⁹ / g	1.7 × 10 ⁹ / g	1.4 × 10 ⁷ / g	1.1 × 10 ⁷ / g
B : une congélation ⇒ 2 jours à 20°C-24°C ⇒ 2ème congélation ⇒ et 2ème décongélation le jour de l'analyse	1.4 × 10 ⁹ / g	1.2 × 10 ⁹ / g	6.2 × 10 ⁵ / g	5.2 × 10 ⁵ / g
C : une congélation ⇒ 3 jours à 20°C - 24°C ⇒ 2ème congélation ⇒ et 2ème décongélation le jour de l'analyse	1.4 × 10 ⁹ / g	1.8 × 10 ⁹ / g	6 × 10 ⁴ / g	4.6 × 10 ⁵ / g

Fiente de dindes collectée le 11 mai 2009

Conditions A ou B'	Microorganismes à 30°C UFC	Entérobactéries à 37°C UFC
1 prise d'essai testée par sac de fiente – 1 sac testé		
A : une seule congélation ⇒ une décongélation le jour de l'analyse	1.7 × 10 ⁹ / g	3 × 10 ⁷ / g (estimation)
B' : une congélation ⇒ 1 jour à 20°C-24°C ⇒ 2ème congélation ⇒ et 2ème décongélation le jour de l'analyse	2.0 × 10 ⁹ / g	2 × 10 ⁷ / g (estimation)

3.3.3 Norme NF U47-100 (Juillet 2007) : Les milieux choisis par les participants

Aucun laboratoire ne prépare un milieu de culture à partir des ingrédients individuels de la composition. Les milieux sont achetés sous forme «déshydraté» ou «prêt à l'emploi».

Les réponses inscrites dans les «rapport de laboratoire» des 71 participants pour lesquels les résultats sont exploitables, sont présentées sous forme de tableaux ci-après.

Il est à noter que parfois les réponses choisies engendrent des incohérences. C'est plus fréquent pour le milieu MSR/V (voir les rubriques en grisé dans le tableau reprenant le questionnaire). Les significations de «milieu prêt à l'emploi», de «milieu de base» et «milieu complet» sont celles des normes de bactériologie NF et ISO. Il y a eu une incompréhension entre l'organisateur et certains participants.

Parmi les réponses incohérentes, la référence du produit acheté est privilégiée, elle est considérée comme juste.

Questionnaire (extrait du "rapport de laboratoire") : Gélose semi solide de Rappaport-Vassiliadis (MSRV)

	Choix des réponses
Fabrication à partir du / de(s) . .	// milieu prêt à couler, en flacon // milieu complet déshydraté (= une poudre) // // milieu de base déshydraté + supplément // des ingrédients (fabrication-maison)
Nom du fournisseur	une liste est proposée
Référence du fabricant (base ou complet)	une liste est proposée
la novobiocine [10mg/L du milieu complet] est incluse dans...	// dans le milieu complet acheté // le supplément (même fabricant) // // le supplément (solution fabriquée au labo)
flacon prêt à couler, re-liquéfaction en ... ¹⁶	// bain-marie bouillant // bain-marie -Température réglée à 96°C // bain-marie -Température réglée à 95°C // // autre à inscrire dans les commentaires
matériel pour la préparation à partir de poudre ¹⁷	// verrerie, plaque ou chauffe-ballon // autopréparateur
contrôle du pH	// jamais contrôlé // contrôle sur chaque lot // contrôle sur quelques lots par an
ensemencement : 0.1 mL déposé ...	// en 1 point, au centre // en 3 points près du centre, peu espacés // en 3 points répartis à équidistance sur la boîte

¹⁶ Réponse attendue, uniquement pour le MSR/V acheté «prêt à l'emploi», en fait en flacon, prêt à couler

¹⁷ Réponse attendue uniquement dans le cas où le MSR/V est préparé à partir d'une poudre

EPT

Fabricant (fournisseur)	Nombre d'utilisateurs pour ce fournisseur	Référence(s)	Nombre d'utilisateurs de la référence																					
AES CHEMUNEX	17 sur 71	milieu complet déshydraté	AES AEB140302 et 140302 et 140303	7	Lab 01	Lab 02	Lab 03	Lab 12	Lab 29	Lab 39	Lab 57													
		milieu prêt à l'emploi	AES AEB 610304, à...10 ou 910303, ...05	10	Lab 11	Lab 27 & 79	Lab 30	Lab 31	Lab 38 & 81	Lab 49 & 76	Lab 52	Lab 65	Lab 71	Lab 84										
BioMérieux	3 sur 71	milieu complet déshydraté	BioMérieux 51094	1	Lab 46																			
		milieu prêt à l'emploi	BioMérieux 42042/43 ou 42629 ou 42729	2	Lab 05 & 77	Lab 48																		
BioRad	4 sur 71	milieu complet déshydraté	BioRad 64684	2	Lab 22	Lab 40																		
		milieu prêt à l'emploi	BioRad 3554179	1	Lab 16																			
		milieu prêt à l'emploi	BioRad 59179	1	Lab 69																			
BIOKAR - SOLABIA	30 sur 71	milieu complet déshydraté	Biokar BK018GC et 018HA	3	Lab 07	Lab 51	Lab 73																	
		milieu complet déshydraté ¹⁸	Biokar BK131GC et 131HA	22	Lab 06	Lab 09	Lab 10	Lab 14	Lab 17	Lab 18	Lab 26	Lab 28	Lab 35	Lab 37	Lab 41	Lab 42	Lab 43	Lab 45	Lab 56	Lab 58	Lab 61	Lab 64 & 83	Lab 67	Lab 68 & 78
		milieu prêt à l'emploi	Biokar BM 01008 et BM13108	5	Lab 70	Lab 74																		
MERCK	5 sur 71	milieu complet déshydraté	Merck 1.0722800500 et .5000	5	Lab 04	Lab 15	Lab 19	Lab 47	Lab 63															
		milieu prêt à l'emploi	Merck 1.0722800500 et .5000	0																				
OXOID	10 sur 71	milieu complet déshydraté	Oxoid CM0509	6	Lab 08	Lab 13	Lab 33 & 75	Lab 34	Lab 36	Lab 72														
		milieu prêt à l'emploi	Oxoid FR59103 et BO0201	3	Lab 23 & 82	Lab 54	Lab 66																	
		milieu prêt à l'emploi	autre réf (non donnée)	1	Lab 53																			
SODIBOX	1 sur 71	milieu prêt à l'emploi	4210-4211	1	Lab 25																			
VWR	1 sur 71	milieu complet déshydraté	réf non donnée	1	Lab 62																			

¹⁸ Les 2 références du milieu « EPT complet déshydraté » fabriqués par BIOKAR ne diffèrent que par le nombre de molécules d'eau (3.56g de phosphate disodique anhydre est équivalent à 9.0g de phosphate disodique dodécahydraté). Selon le § 4.1.2 de la norme CEN ISO / TS 11133-2 : 2003, Qualité des composants de base des milieux, il est admis que les fabricants de milieux modulent la concentration de certains ingrédients biologiques de base.

MSRV

Fabricant (fournisseur)	Nombre d'utilisateurs pour ce fournisseur	Réf. du milieu complet /base	ajout du supplément (sol. novobiocine)	Nombre d'utilisateurs de la référence															
BIOKAR - SOLABIA	44	milieu de base déshydraté + supplément	Biokar BK 134 HA	le supplément (même fabricant)	4	Lab 03	Lab 04	Lab 17	Lab 56										
		milieu de base déshydraté + supplément	Biokar BK 134 HA	le supplément (solution fab. au labo)	4	Lab 08	Lab 39	Lab 41	Lab 58										
		milieu complet déshydraté	Biokar BK 191 HA	dans le milieu complet acheté	15	Lab 06	Lab 18	Lab 19	Lab 26	Lab 35	Lab 37	Lab 42	Lab 43	Lab 45	Lab 46				
		milieu prêt à couler, en flacon	Biokar BM 12708	dans le milieu complet acheté ¹⁹	21	Lab 09	Lab 11	Lab 14 & 80	Lab 16	Lab 20	Lab 22	Lab 23 & 82	Lab 27 & 79	Lab 30	Lab 31				
						Lab 36	Lab 38 & 81	Lab 44	Lab 59	Lab 60	Lab 61	Lab 64 & 83	Lab 65 ¹⁹	Lab 70	Lab 71				
						Lab 74													
BIO MERIEUX	10	milieu prêt à couler, en flacon	BioMérieux 42 639	dans le milieu complet acheté	10	Lab 02	Lab 05 & 77	Lab 07	Lab 12	Lab 25	Lab 48	Lab 49 & 76	Lab 63	Lab 66	Lab 73				
AES CHEMUNEX	3	milieu de base déshydraté + supplément	AES AEB140672	le supplément (solution fab. au labo)	2	Lab 10	lab 28												
		indiqué «complet»	AES AEB140672	non renseigné	1	Lab 62													
BIO RAD	7	milieu de base déshydraté + supplément	BioRad 356-4325	le supplément (même fabricant)	1	Lab 52													
		milieu de base déshydraté + supplément	BioRad 356-4325	le supplément (solution fab. au labo)	2	Lab 01	Lab 57												
		milieu prêt à couler, en flacon	BioRad 355-6139	dans le milieu complet acheté	4	Lab 15	Lab 40	Lab 54	Lab 69										
OXOID	6	milieu de base déshydraté + supplément	Oxoid CM0910	le supplément (même fabricant)	1	Lab 13													
		indiqué «complet»	Oxoid CM0910	le supplément (même fabricant)	5	Lab 29	Lab 34	Lab 53	Lab 55	Lab 84									
Becton Dickinson	1	milieu complet deshydraté (= une poudre)	ref Fabricant DIFCO 218681	le supplément (même fabricant)	1	Lab 33 & 75													

Note 1: Toutes les réf «milieu complet» contiennent 10 mg /L de novobiocine = concentration de la composition de la norme NF U47-100;juillet 2007.

Note 2 : les options surlignées correspondent à des incohérences ou à des erreurs dans les réponses.

¹⁹ Le Lab65 signale que le supplément (solution de novobiocine) est fabriqué au laboratoire ; ce qui n'est pas cohérent avec l'achat d'un milieu complet prêt à couler.

Préparation du MSRVR

MSRVR prêt à couler (35 utilisateurs)		Nbre	Codes des utilisateurs											
	non renseigné	1	Lab 30											
	bain-marie bouillant	22	Lab 09	Lab 11	Lab 12	Lab 14	Lab 16	Lab 20	Lab 22	Lab 31	Lab 36	Lab 38	Lab 80	Lab 81
			Lab 40	Lab 48	Lab 49	Lab 59	Lab 60	Lab 61	Lab 64	Lab 65	Lab 66	Lab 69	& 76	& 83
modalité de la liquéfaction de la gélose en flacon, avant de la couler en boîte de Petri	bain-marie -Température réglée à 96°C	2	Lab 23	Lab 44										
	bain-marie -Température réglée à 95°C	6	Lab 02	Lab 25	Lab 27	Lab 63	Lab 70	Lab 74						
	re-liquéfié au bain-marie 20 min à 90°C.	1	Lab 07											
	Bain-marie à 50°C	1	Lab 15											
	Utilisation à froid du milieu. Pas de régénération	1	Lab 54											
	bain-marie bouillant pour les éch du code Lab05	1	Lab 05											
	MSRVR a été re-liquéfié par agitation manuelle pour les éch du Lab77		& 77											
	non renseigné	18	Lab 05	Lab 12	Lab 14	Lab 16	Lab 20	Lab 22	Lab 23	Lab 25	Lab 31	Lab 44	& 77	& 80
			Lab 48	Lab 49	Lab 60	Lab 65	Lab 66	Lab 69	Lab 70	Lab 74				
			& 76											
contrôle du pH	contrôle sur chaque lot	2	Lab 09	Lab 15										
	contrôle sur quelques lots par an	1	Lab 07											
	jamais contrôlé	14	Lab 02	Lab 11	Lab 27	Lab 30	Lab 36	Lab 38	Lab 40	Lab 54	Lab 59	Lab 61	& 79	& 81
			Lab 63	Lab 64	Lab 71	Lab 73								
			& 83											

MSRVR acheté en poudre (36 utilisateurs)		Nbre	Codes des utilisateurs												
matériel pour la préparation à partir de poudre	verrerie, plaque ou chauffe-ballon	19	Lab 01	Lab 04	Lab 13	Lab 18	Lab 19	Lab 28	Lab 29	Lab 33	Lab 34	Lab 35	Lab 75	Lab 84	
			Lab 41	Lab 42	Lab 45	Lab 51	Lab 53	Lab 55	Lab 56	Lab 72	Lab 84				
	autopréparateur	17	Lab 03	Lab 06	Lab 08	Lab 10	Lab 17	Lab 26	Lab 37	Lab 39	Lab 43	Lab 46			
			Lab 47	Lab 52	Lab 57	Lab 58	Lab 62	Lab 67	Lab 68	Lab 78					
contrôle du pH	contrôle sur chaque lot	36	Tous les codes cités ci dessus												

Remarque 1 : la performance du milieu MSRVR est particulièrement corrélée avec les conditions de préparation de ce milieu. Il ne doit pas être "trop chauffé".

Le questionnaire n'est pas assez complet pour mieux le préciser.

Remarque 2 : actuellement les fabricants proposent un MSRVR avec un pH compris entre 5.1 et 5.4. Avant la normalisation du MSRVR, le pH du milieu de quelques fabricants était plus élevé. Des observations rapportaient une moindre performance avec un pH plus élevé.

MSRV : ensemencement de 0.1 mL déposé	Nbre	Codes des utilisateurs									
en 1 point, au centre	40	Lab 01	Lab 04	Lab 05 & 77	Lab 08	Lab 09	Lab 11	Lab 12	Lab 13	Lab 14 & 80	Lab 17
		Lab 20	Lab 22	Lab 25	Lab 26	Lab 27 & 79	lab 28	Lab 30	Lab 34	Lab 35	Lab 37
		Lab 39	Lab 40	Lab 42	Lab 43	Lab 45	Lab 46	Lab 47	Lab 51	Lab 53	Lab 55
		Lab 58	Lab 59	Lab 60	Lab 62	Lab 63	Lab 65	Lab 68 & 78	Lab 70	Lab 74	Lab 84
en 3 points près du centre, peu espacés	6	Lab 03	Lab 06	Lab 15 & 81	Lab 38	Lab 48	Lab 52				
en 3 points répartis à équidistance sur la boîte	25	Lab 02	Lab 07	Lab 10	Lab 16	Lab 18	Lab 19	Lab 23 & 82	Lab 29	Lab 31	Lab 33 & 75
		Lab 36	Lab 41	Lab 44	Lab 49 & 76	Lab 54	Lab 56	Lab 57	Lab 61	Lab 64 & 83	Lab 66
		Lab 67	Lab 69	Lab 71	Lab 72	Lab 73					

MKTT(n) Fabricant (fournisseur)	Nombre d'utilisateurs pour ce fournisseur	Présentation du milieu acheté	Réf. du milieu complet /base	Présence ou non de la novobiocine dans le milieu complet utilisé	Quantité utilisée	Utilisateur: nombre'	Code du/des utilisateur(s)
AES CHEMUNEX	27	milieu prêt à l'emploi en tube	AES AEB 110710	avec novobiocine	tube de 20 mL	1	Lab 72
		milieu prêt à l'emploi en tube	AES AEB 110710	sans novobiocine	tube de 20 mL	2	Lab 55 Lab 84
		milieu prêt à l'emploi en tube	AES AEB 121609	avec novobiocine	tube de 10 mL	22	Lab 02 Lab 10 Lab 11 Lab 12 Lab 13 ²⁰ Lab 14 Lab 19 Lab 22 & 80
							Lab 27 lab 28 Lab 29 Lab 30 Lab 33 Lab 34 Lab 42 Lab 45 & 79 & 75
							Lab 49 Lab 52 Lab 54 Lab 61 Lab 62 Lab 74 & 76
		milieu complet déshydraté	AES AEB 140902	sans novobiocine	tube de 20 mL	2	Lab 01 Lab 47
BIO MERIEUX	6	milieu prêt à l'emploi en tube	BioMérieux 42114	avec novobiocine	tube de 10 mL	6	Lab 05 Lab 07 Lab 23 Lab 40 Lab 57 Lab 64 & 83 & 77 & 82
BIOKAR-SOLABIA	31	milieu complet déshydraté	Biokar BK 135 HA	sans novobiocine	tube de 10 mL	1	Lab 04
		milieu complet déshydraté	Biokar BK 135 HA	avec novobiocine	tube de 20 mL	1	Lab 58
		milieu complet déshydraté	Biokar BK 169 HA	sans novobiocine	tube de 20 mL	3	Lab 03 Lab 06 Lab 08
		milieu complet déshydraté	Biokar BK 169 HA	avec novobiocine	tube de 10 mL	2	Lab 39 Lab 43
		milieu complet déshydraté	Biokar BK 169 HA	avec novobiocine	tube de 20 mL	2	Lab 56 Lab 68 & 78
		milieu prêt à l'emploi en tube	Biokar BM 07808	avec novobiocine	tube de 10 mL	20	Lab 09 Lab 16 Lab 18 Lab 20 Lab 25 Lab 26 Lab 31 Lab 35 Lab 37 Lab 38 Lab 41 Lab 48 Lab 51 Lab 59 Lab 60 Lab 65 & 81
							Lab 67 Lab 70 Lab 71 Lab 73
		milieu prêt à l'emploi en tube	Biokar BM 10608	avec novobiocine	tube de 10 mL	2	Lab 17 Lab 46
BIO RAD	5	milieu prêt à l'emploi en tube	BioRad 355-6145	sans novobiocine	tube de 10 mL	2	Lab 36 Lab 66
		milieu prêt à l'emploi en tube	BioRad 355-6140	avec novobiocine	tube de 10 mL	3	Lab 15 Lab 44 Lab 69
OXOID	2	milieu prêt à l'emploi en tube	Oxoid TV 5065E	avec novobiocine	tube de 10 mL	2	Lab 53 Lab 63

Note : La composition des références AES AEB 110710 et BioRad 355-6145 correspond à la composition 1 de la version de 2005 de la norme NF U 47-100. La version actuelle de juillet 2007 ne décrit qu'une seule composition du MKTT(n), correspondant à la composition 2 de la version de 2005. Aussi les lab 36-55-66-72-84 utilisent un bouillon MKTT qui a une composition différente de celle de la norme.

²⁰ Il y a une incohérence dans les réponses pour le milieu MKTTn : le lab13 indique utiliser du milieu sans novobiocine alors qu'elle est présente dans le milieu acheté prêt à l'emploi en tube.

Gélose XLD	Nombre de laboutilisateurs pour ce fournisseur	Référence(s)	Nombre de labo utilisateurs de la référence	Codes des labo utilisateurs	
AES CHEMUNEX	14				
		milieu complet deshydraté	AES AEB 153402	1	Lab 57
		milieu prêt à l'emploi en boîte	AEB 523399 et /400	9	Lab 06 Lab 11 Lab 14 Lab 19 Lab 27 Lab 30 & 80 & 79
					Lab 70 Lab 73 Lab 74
		milieu prêt à l'emploi en boîte	AEB 523410	1	Lab 49 & 76
		gélose prête à l'emploi en boîte	SALSA (biboîte XLD et ASAP) AES 526760	3	Lab 22 Lab 42 Lab 61
BIOKAR - SOLABIA	23				
		milieu complet deshydraté	BK168HA	12	Lab 03 Lab 04 Lab 08 Lab 17 Lab 26 Lab 29 Lab 39 Lab 41 Lab 43 Lab 47 Lab 58 Lab 68 & 78
		milieu prêt à l'emploi en boîte	BM08708	11	Lab 09 Lab 20 Lab 25 Lab 38 Lab 45 Lab 46 & 81
					Lab 51 Lab 59 Lab 60 Lab 65 Lab 71
BIO MERIEUX	9	milieu prêt à l'emploi en boîte	43563 et 43564	9	Lab 07 Lab 12 Lab 16 Lab 35 Lab 55 Lab 63 Lab 66 Lab 67 Lab 84
BIO RAD	8	milieu prêt à l'emploi en boîte	354-1751	8	Lab 15 Lab 33 Lab 40 Lab 44 Lab 48 Lab 52 & 75
					Lab 54 Lab 69
MERCK (VWR)	2	milieu complet deshydraté	1.05287.0500 ou / .5000	2	Lab 10 Lab 62
OXOID	15	milieu prêt à l'emploi en boîte	CM0469	2	Lab 36 Lab 72
		milieu prêt à l'emploi en boîte	PO5057A	13	Lab 01 Lab 02 Lab 05 Lab 13 Lab 18 Lab 23 & 77 & 82
					lab 28 Lab 31 Lab 34 Lab 37 Lab 53 Lab 56
					Lab 64 & 83

Pour la composition de la Gélose XLD, il existe 3 compositions sur le marché. Les références en grisé diffèrent légèrement par la quantité de Xylose et de désoxycholate de la composition normalisée ISO 6579, et NF U 47-100 publiée en juillet 2007.

2^{ème} gélose d'isolement du MSRV

Fabricant	Référence	Nbre d'utilisateurs	Code des utilisateurs																				
			Lab 02	Lab 03	Lab 06	Lab 12	Lab 14	Lab 15	Lab 19	Lab 27	Lab 30	Lab 33	Lab 41	Lab 48	Lab 52	Lab 53	Lab 55	Lab 58	Lab 62	Lab 66	Lab 70	Lab 73	
ASAP	AES CHEMUNEX milieu prêt à l'emploi en boîte	AEB 520089 & /90	21	Lab 02	Lab 03	Lab 06	Lab 12	Lab 14 & 80	Lab 15	Lab 19	Lab 27 & 79	Lab 30	Lab 33 & 75	Lab 41	Lab 48	Lab 52	Lab 53	Lab 55	Lab 58	Lab 62	Lab 66	Lab 70	Lab 73
SALSA (biboîte XLD et ASAP)	AES CHEMUNEX milieu prêt à l'emploi en boîte	AES 526760	3	Lab 22	Lab 42	Lab 61																	
Hektoen			13																				
Hektoen	BIO MERIEUX milieu prêt à l'emploi en boîte	43111	4	Lab 07	Lab 37	Lab 40	Lab 49 & 76																
Hektoen	BIO RAD milieu prêt à l'emploi en boîte	356-3894	3	Lab 18	lab 28	Lab 45																	
Hektoen	BIO RAD milieu complet deshydraté	356-4284	2	Lab 01	Lab 57																		
Hektoen	OXOID milieu prêt à l'emploi en boîte	PO5100A	2	Lab 65	Lab 72																		
Hektoen	BIOKAR - SOLABIA milieu complet deshydraté	BK067HA	1	Lab 43																			
Hektoen	MERCK milieu complet deshydraté	1.11681.0500	1	Lab 10																			
Compass	BIOKAR - SOLABIA milieu prêt à l'emploi en boîte	BM 06608	13	Lab 09	Lab 16	Lab 20	Lab 25	Lab 31	Lab 35	Lab 38	Lab 46	Lab 47	Lab 51 & 81	Lab 59	Lab 67	Lab 84							
ChromID™ Salmonella (ancien nom : SM ID 2)	BIO MERIEUX milieu prêt à l'emploi en boîte	43 621 ou 43 629	5	Lab 08	Lab 17	Lab 36	Lab 63	Lab 64 & 83															
Rambach	MERCK milieu complet deshydraté	1.07500.0002	2	Lab 04	Lab 39																		
Rambach	MERCK milieu prêt à l'emploi en boîte	1.13999.0001 / 02	4	Lab 29	Lab 44	Lab 60	Lab 71																
Brillance™ Salmonella (OSCM II)	OXOID milieu prêt à l'emploi en boîte	PO5098A	4	Lab 05	Lab 11	Lab 56	Lab 68 & 78 & 77																
RAPID'Salmonella	BIO RAD milieu prêt à l'emploi en boîte	3 563 961	4	Lab 13	Lab 23 & 82	Lab 34	Lab 54																
XLT4	BIO RAD milieu prêt à l'emploi en boîte	356-3654	1	Lab 69																			
GVB ou BGA (rouge de phénol et vert brillant-Edel et Kampelmacher)	BIOKAR - SOLABIA milieu complet deshydraté	BK091	1	Lab 26																			

Isolement du MKTT(n) : 1 gélose ou 2 géloses utilisées

gélose(s) d'isolement du MKTT(n)	Fabricant		Référence	Nbre d'utilisa- teurs	Code des utilisateurs												
XLT4				35													
XLT4	BIO RAD	milieu prêt à l'emploi en boîte	356-3654	8	Lab 23 & 82	Lab 33 & 75	Lab 34	Lab 40	Lab 51	Lab 62	Lab 69	Lab 84					
XLT4	AES CHEMUNEX	milieu prêt à l'emploi en boîte	AEB 523419 / 20	5	Lab 06	Lab 29	Lab 30	Lab 57	Lab 70								
XLT4	OXOID	milieu prêt à l'emploi en boîte	PO5116A	9	Lab 18	Lab 22	lab 28	Lab 31	Lab 37	Lab 42	Lab 55	Lab 61	Lab 65				
XLT4	BIOKAR - SOLABIA	milieu prêt à l'emploi en boîte	BM 03608	7	Lab 35	Lab 38	Lab 45	Lab 46	Lab 56	Lab 59	Lab 60						
XLT4	BIO MERIEUX	milieu prêt à l'emploi en boîte	43701	1	Lab 71												
XLT4	MERCK	milieu complet déshydraté	1.13919.0500	1	Lab 47												
XLT4	BIOKAR - SOLABIA	milieu complet déshydraté	BK 156 HA	3	Lab 39	Lab 41	Lab 43										
XLT4	AES CHEMUNEX	milieu complet déshydraté	AEB 153412	1	Lab 10												
ASAP	AES CHEMUNEX	milieu prêt à l'emploi en boîte	AEB 520089/90	12	Lab 03 Lab 66	Lab 12 Lab 73	Lab 14	& 80	Lab 15	Lab 19	Lab 41	Lab 48	Lab 52	Lab 53	Lab 58		
Hektoen				5													
Hektoen	BIOKAR - SOLABIA	milieu prêt à l'emploi en boîte	BM 02708	1	Lab 64	& 83											
Hektoen	BIO MERIEUX	milieu prêt à l'emploi en boîte	43111	2	Lab 07	Lab 25											
Hektoen	OXOID	milieu prêt à l'emploi en boîte	PO 5100A	1	Lab 72												
Hektoen	BIO RAD	milieu complet déshydraté	356-4284	1	Lab 01												
XLD				17	Lab 02	Lab 07	Lab 08	Lab 12	Lab 13	Lab 16	Lab 23 & 82	Lab 26	Lab 27 & 79	Lab 30	Lab 36		
					Lab 49 & 76	Lab 53	Lab 64 & 83	Lab 69	Lab 72	Lab 74							
ChromID™ Salmonella (ancien nom : SM ID 2)	BIO MERIEUX	milieu prêt à l'emploi en boîte	43 621 ou 43 629	2	Lab 08	Lab 63											
Compass	BIOKAR - SOLABIA	milieu prêt à l'emploi en boîte	BM 06608	4	Lab 09	Lab 20	Lab 38	& 81	Lab 67								
Brilliance™ Salmonella (OSCM II)	OXOID	milieu prêt à l'emploi en boîte	PO5098A	2	Lab 05	Lab 11											
RAPID™ Salmonella	BIO RAD	milieu prêt à l'emploi en boîte	356-3961	2	Lab 44	Lab 54											
Rambach	MERCK	milieu complet déshydraté	1.07500.0002	1	Lab 04												
Rambach	MERCK	milieu prêt à l'emploi en boîte	1.13999.0001 ou /02	2	Lab 44	Lab 29											
non renseigné				2	Lab 17	Lab 68	& 78										
2 géloses d'isolement utilisées				13	Lab 07	Lab 08	Lab 12	Lab 23 & 82	Lab 29	Lab 30	Lab 38 & 81	Lab 41	Lab 44	Lab 53	Lab 64 & 83		
					Lab 69	Lab 72											

3.3.4 Résultats par laboratoire, retenus à la suite des 1^{ère} et 2^{ème} séries d'échantillons

Un nouveau participant a réalisé des analyses du 22 au 30 juin 2009. Ses résultats sont inclus. Les résultats des 71 participants (Lab 1 à Lab 84) qui ont fourni des résultats selon les deux normes figurent ci-après.

Les tableaux et graphiques du paragraphe (3.2.3) du rapport intermédiaire de mai 2009 sont modifiés comme suit

Les contrôles (lenticule seule)

Tableau 1 : Résultats des échantillons-Contrôles obtenus par les 71 laboratoires

		NF U 47-100 : juillet 2007		NF U 47-100 adaptée (MSRV)	
		N ^{bre} de labo ayant obtenus ces résultats	Code des Lab	N ^{bre} de labo ayant obtenus ces résultats	Code des Lab
Nombre de positifs parmi les 2 "contrôle SE-10" analysés	2 positifs	70		70	
	1 pos sur 1 analysé ♣	1	Lab 09	1	Lab 09
Nombre de négatifs parmi les 2 "contrôle blanc " analysés	2 négatifs	71		71	

♣ au vu de l'ensemble des résultats du Lab09, l'organisateur n'a pas jugé utile de proposer des tests supplémentaires

Les échantillons-test non contaminés par Salmonella (fiente + lenticule "blanc"):

Aucun faux positif n'est à relever parmi les résultats des 71 laboratoires.

Les échantillons-test contaminés par *Salmonella*:

Les colonnes représentent pour chaque laboratoire, le nombre de résultats positifs parmi les 5 réplicats de chaque niveau testé (niveau fort = SE-100, niveau modéré = SE-10).

Figure 1 : Résultats des échantillons-tests contaminés par *S. Enteritidis* au niveau fort (SE-100) obtenus par les laboratoires codés 1 à 38

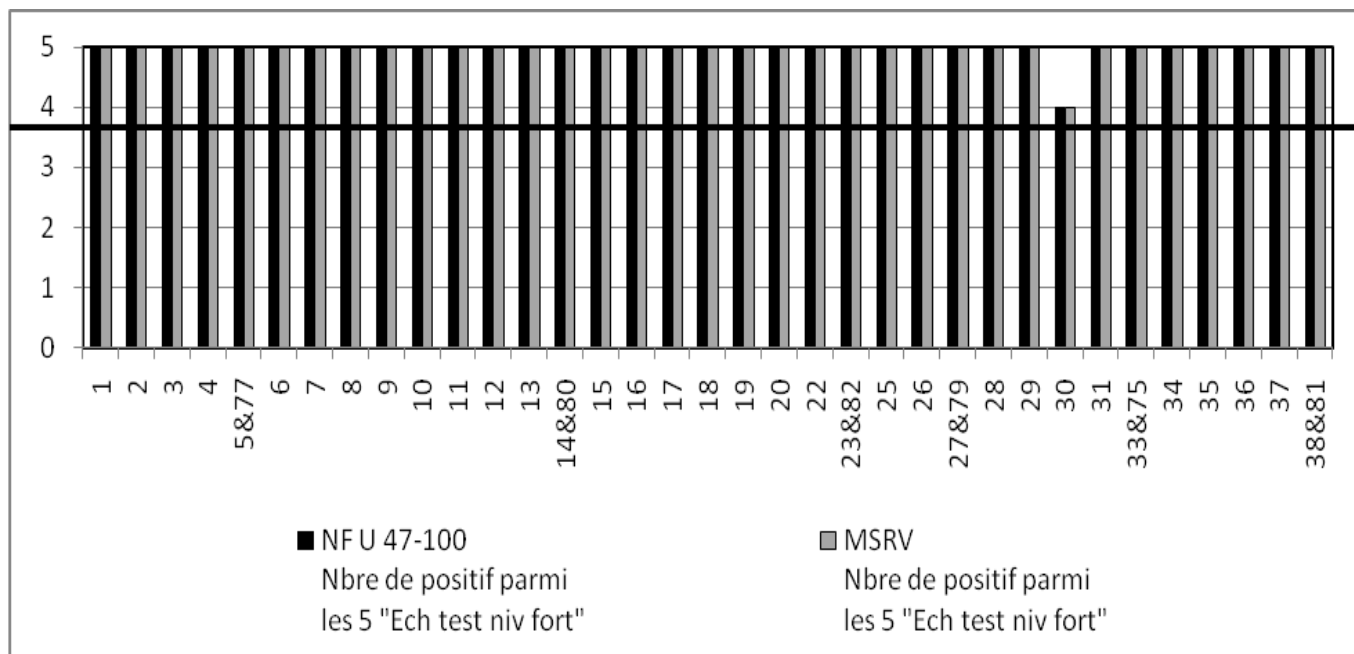


Figure 2 : Résultats des échantillons-tests contaminés par *S. Enteritidis* au niveau intermédiaire (SE-10) obtenus par les laboratoires codés 1 à 38

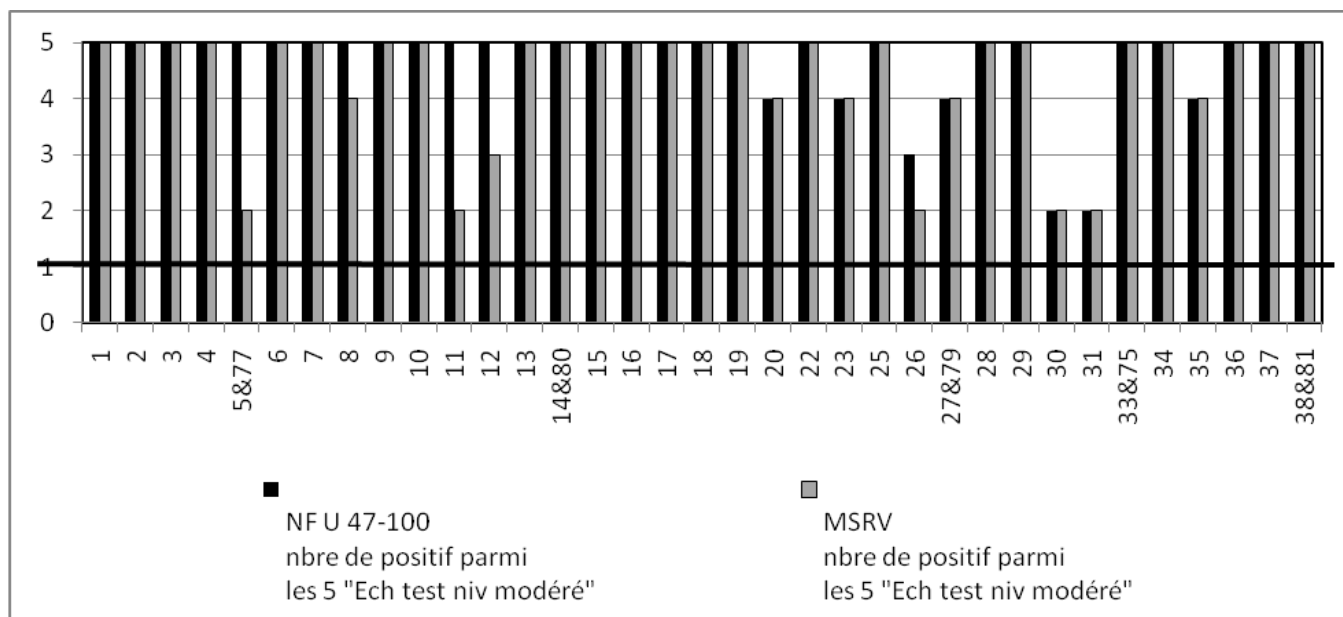
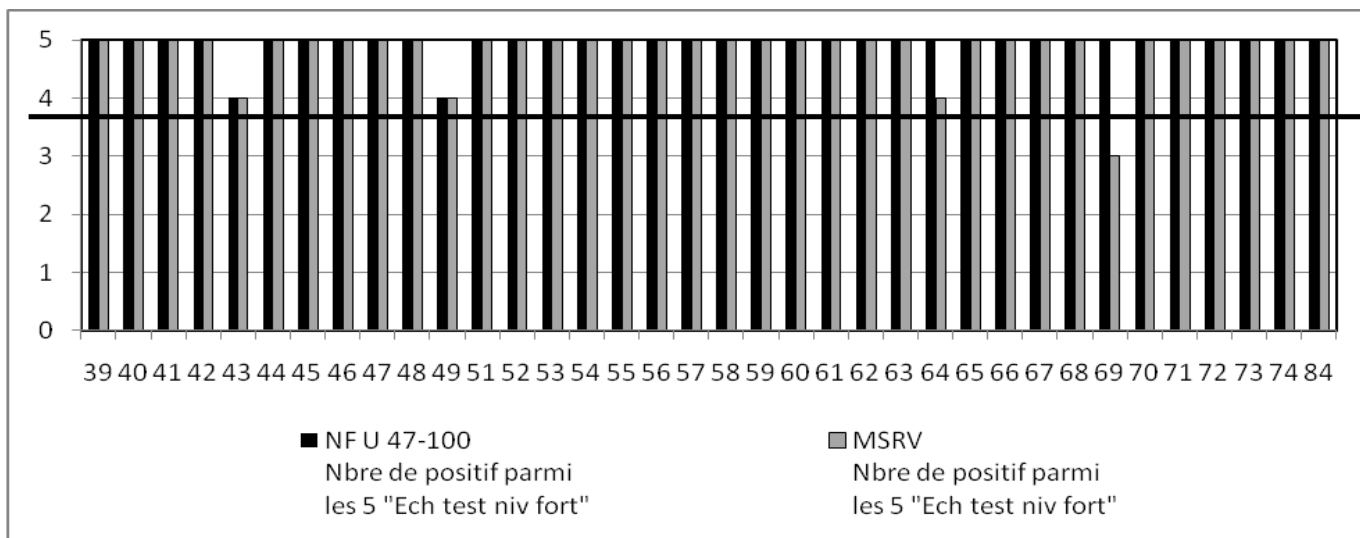
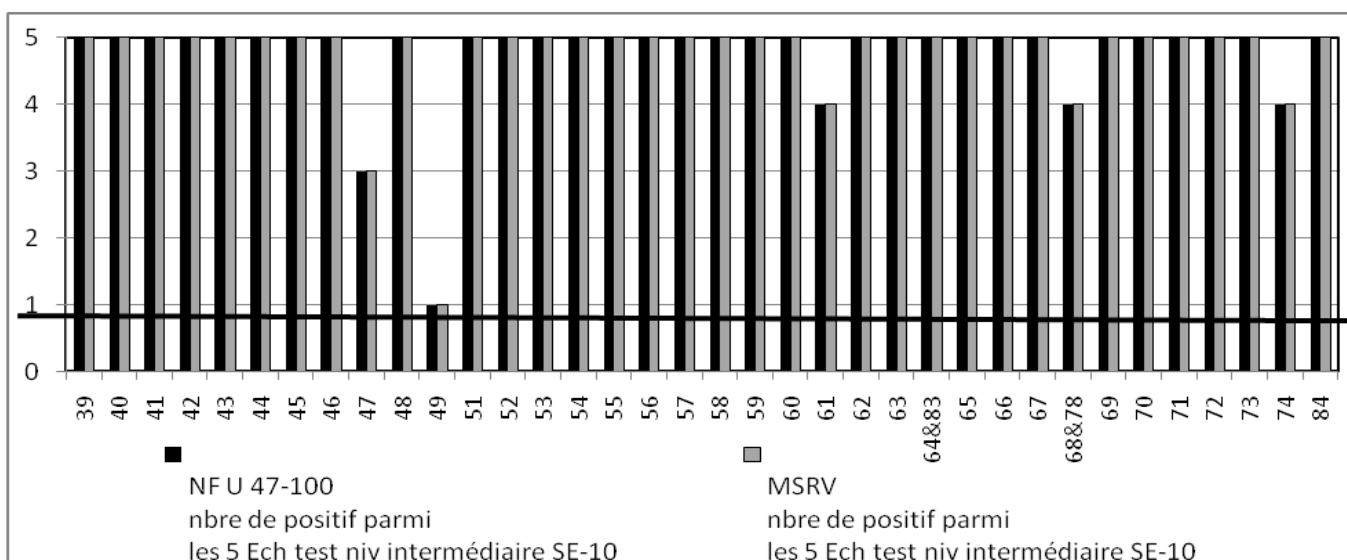


Figure 3 : Résultats des échantillons-tests contaminés par *S. Enteritidis* au niveau fort (SE-100) obtenus par les laboratoires codés 39 à 84



Le Lab 44 a utilisé la norme ISO 6579/A1-annexe D. Les autres laboratoires ont suivi la NFU 47-100 adaptée.

Figure 4 : Résultats des échantillons-tests contaminés par *S. Enteritidis* au niveau intermédiaire (SE-10) obtenus par les laboratoires codés 39 à 84



3.3.5 Performance des laboratoires

Performance des laboratoires pour la norme NF U47-100

Les résultats obtenus à la suite des deux sessions montrent que **l'ensemble des 71 laboratoires** satisfont aux critères de performance pour la norme NF U 47-100.

Performance des laboratoires pour la voie MSR_V = NF U47-100 adaptée

Pour la voie MSR_V, quelques laboratoires ont eu des écarts pour l'un ou les deux niveaux de contamination SE-10 et SE-100 lors de la 1^{ère} série d'analyse de mars-avril.

A la suite des analyses complémentaires, **les résultats sont satisfaisants pour tous les 71 laboratoires**. Les principales causes des écarts sont le non respect de la préparation spéciale des échantillons pour cet EIL et/ou surtout la préparation du lot de MSR_V lors de la première session.

3.3.6 Comparaison des résultats des laboratoires en fonction de la méthode

Figure 5 : Comparaison des résultats obtenus par les 71 laboratoires pour les 5 échantillons artificiellement contaminés avec les lenticules SE 100

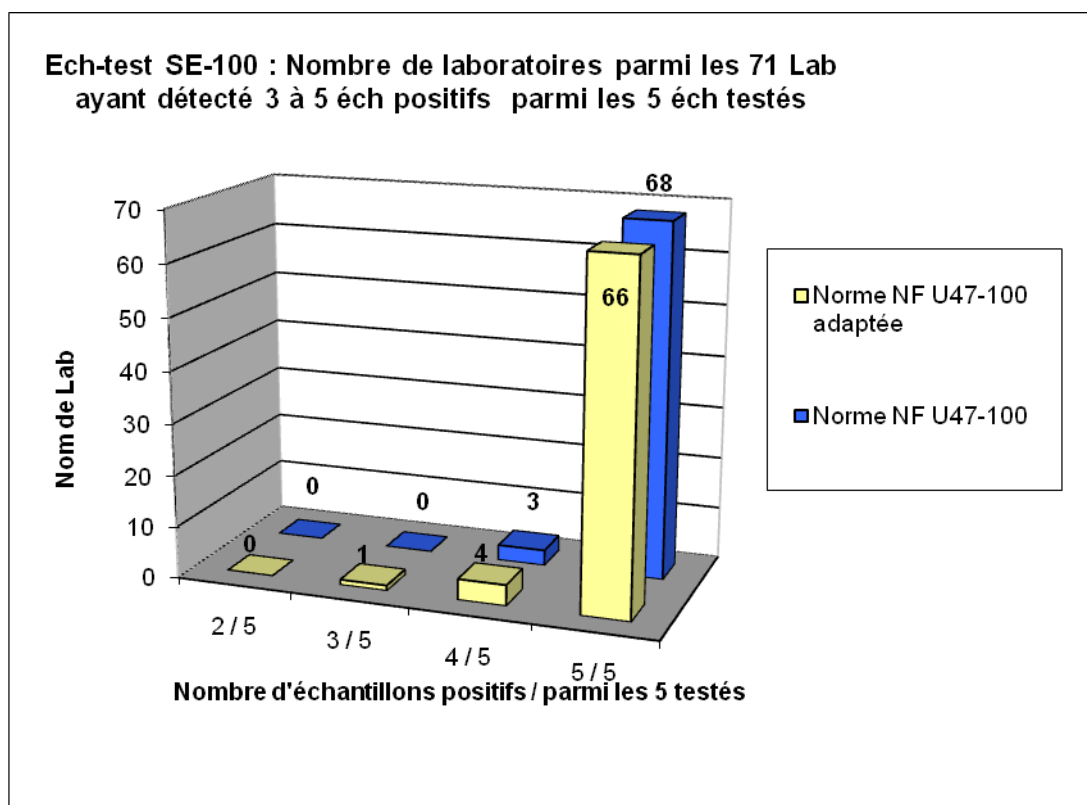
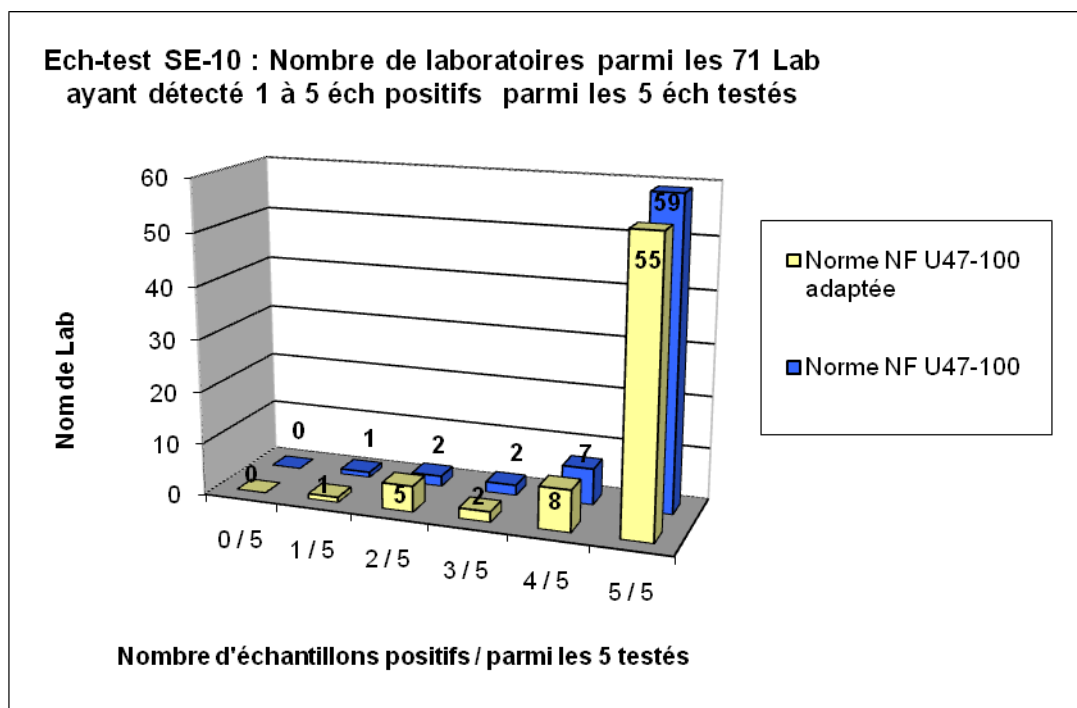


Figure 6 : Comparaison des résultats obtenus par les 71 laboratoires pour les 5 échantillons artificiellement contaminés avec les lenticules SE 10



3.3.7 Calcul de la spécificité, sensibilité et justesse de la méthode NF U47-100 pour la souche *S. Enteritidis* NCTC 6676

Tableau 2 : Tableau : Spécificité, sensibilité, et justesse de la méthode pour des échantillons-contrôles : lenticules contenant ou non la souche *S. Enteritidis* NCTC 6676, en absence de fiente
Résultats des 71 participants

lenticule - contrôle		NF U47-100: version publiée en juillet 2007	NF U47-100 adaptée (voie MSRV)
blanc	Nombre d'échantillons analysés	142	142
	Nombre d'échantillons négatifs	142	142
	Spécificité en %	100 %	100 %
SE-10	Nombre d'échantillons analysés	141	141
	Nombre d'échantillons positifs	141	141
	Sensibilité en %	100 %	100 %
Total	Nombre d'échantillons analysés	283	283
	Nombre d'échantillons corrects	283	283
	Justesse en %	100 %	100 %

Tableau 3 : Tableau : Spécificité, sensibilité, et justesse de la méthode pour des échantillons-tests : lenticules contenant ou non la souche *S. Enteritidis* NCTC 6676, en présence de 10 g de fiente
Résultats des 71 participants

Echantillon-test (lenticule + fiente)		NF U47-100: version publiée en juillet 2007	NF U47-100 adaptée (voie MSRV)
blanc	Nombre d'échantillons analysés	352	352
	Nombre d'échantillons négatifs	352	352
	Spécificité en %	100 %	100 %
SE-10	Nombre d'échantillons analysés	355	355
	Nombre d'échantillons positifs	334	324
	Sensibilité en %	94.1 %	91.3 %
SE-100	Nombre d'échantillons analysés	355	355
	Nombre d'échantillons positifs	352	349
	Sensibilité en %	99.2 %	98.3 %
Total	Nombre d'échantillons analysés	1062	1062
	Nombre d'échantillons corrects	1038	1025
	Justesse en %	97.7 %	96.5 %

La sensibilité des échantillons-tests, au niveau intermédiaire SE-10 est nettement supérieure aux 50% attendus. Un biais peut être possible. Car certains participants utilisent ces échantillons pour comparer des milieux de culture ou pour tester la performance des opérateurs. Le résultat fourni à l'organisateur pour un échantillon peut alors être la synthèse de ces divers tests. Il n'est plus le résultat d'une analyse unique.

Les documents envoyés aux laboratoires mentionnent seulement de pratiquer la norme NF U 47-100 "*selon vos choix de milieux habituellement utilisés lors des contrôles*" (lettre d'annonce en annexe 1). Et le protocole n'insiste pas sur le nombre d'analyse pour chaque échantillon.

En comparaison, les résultats lors de l'essai intercomparaison organisé par le LCR-*Salmonella* en 2008 pour les 32 laboratoires des pays européens sont rappelés dans le tableau ci-après. Le contrôle du nombre de *Salmonella* par capsule (testé sur 25 capsules) au moment des analyses interlaboratoires était en moyenne de 7 *S. Enteritidis* par capsule avec un minimum de 0 et un maximum de 17.

Table 18 Specificity, sensitivity and accuracy rates of the artificially contaminated chicken faeces samples (each capsule added to 10 g chicken faeces) for the selective enrichment on MSRV and plating out on XLD or non-XLD.

Capsules with Chicken faeces		MRVS/ XLD		MSRV/ non-XLD*	
		All n=32	EU MS n=28	All n=32	EU MS n=28
Blank (n=5)	No. of samples	160	140	185	165
	No. of negative samples	160	140	185	165
	Specificity in%	100	100	100	100
STM5 (n=5)	No. of samples	160	140	185	165
	No. of positive samples	151	132	163	151
	Sensitivity in%	94.4	94.3	88.1	91.5
STM50 (n=5)	No. of samples	160	140	185	165
	No. of positive samples	159	140	177	162
	Sensitivity in%	99.4	100	95.7	98.2
SE10 (n=5)	No. of samples	160	140	185	165
	No. of positive samples	89	79	97	89
	Sensitivity in%	55.6	56.4	52.4	53.9
SE100 (n=5)	No. of samples	160	140	185	165
	No. of positive samples	157	140	176	163
	Sensitivity in%	98.1	100	95.1	98.8
All capsules with <i>Salmonella</i>	No. of samples	640	560	740	660
	No. of positive samples	556	491	613	565
	Sensitivity in%	86.9	87.7	82.8	85.6
All capsules	No. of samples	800	700	925	825
	No. of correct samples	716	631	798	730
	Accuracy in%	89.5	90.1	86.3	88.5

* Four laboratories used more than one non XLD isolation medium

Les résultats en 2009 pour la sensibilité de la méthode ISO6579/Amd1 pour les échantillons de fientes contaminés par SE-20, des 34 laboratoires des pays en Europe ²¹ sont proches de la sensibilité calculée pour l'essai interlaboratoire en France en 2009.

La moyenne du nombre de *Salmonella* par capsule des lots utilisés au moment des analyses inter-laboratoires sera donnée dans le rapport final à publier.

Table 3 Specificity, sensitivity and accuracy rates of the artificially contaminated faeces samples (capsules in combination with faeces) n=34.

Capsules with faeces		MRVS/XLD	MSRV/non XLD*
Blank	No. of samples	170	205
	No. of negative samples	169	204
	Specificity in %	99.4	99.5
STM5	No. of samples	170	205
	No. of positive samples	167	197
	Sensitivity in %	98.2	96.1
STM50	No. of samples	170	205
	No. of positive samples	169	199
	Sensitivity in %	99.4	97.1
SE20	No. of samples	170	205
	No. of positive samples	162	190
	Sensitivity in %	95.3	92.7
SE100	No. of samples	170	205
	No. of positive samples	170	200
	Sensitivity in %	100	97.6
All capsules with <i>Salmonella</i>	No. of samples	680	820
	No. of positive samples	668	786
	Sensitivity in %	98.2	95.9
All capsules	No. of samples	850	1025
	No. of correct samples	837	990
	Accuracy in %	98.5	96.6

*Seven laboratories used more than one non XLD isolation medium

²¹ A.F.A. Kuijpers & K.A. Mooijman (RIVM, The Netherlands) Interim summary report CRL-*Salmonella* - Interlaboratory Comparison study Veterinary XII (2009) on Bacteriological Detection of *Salmonella* in chicken faeces.

3.3.8 Comparaison des résultats selon les deux normes

Les résultats pris en compte pour cette comparaison sont ceux obtenus pour les échantillons-tests SE-100 et SE-10, pour lesquels la phase de pré-enrichissement est commune ; la deuxième feuille du rapport de laboratoire étant renseignée.

Le nombre d'échantillons retenus est de «échantillons fientes+SE-100» et de 335 échantillons «fientes+SE-10».

Tableau 4 : Nombre de résultats positifs et négatifs en fonction de la norme

NF U 47-100 : version publiée en Juillet 2007	NF U 47-100 adaptée (voie MSR V)	Nombre d'échantillon-test fiente+SE 100	Nombre d'échantillon-test fiente+SE 10
négatif	négatif	2	19
positif	négatif	3	9
positif	positif	330 (98.5%)	307 (91.6%)

3.3.9 Résultats détaillés obtenus avec la norme NF U47-100 adaptée, en fonction des milieux de culture, de la durée d'incubation du MSR V

Tableau 5 : Nombre de résultats positifs en fonction de la durée d'incubation de la gélose MSR V

fientes + lenticule SE-100		fientes + lenticule SE-10	
330 échantillons détectés positifs par la voie MSR V / XLD + 2 ^{ème} gélose d'isolement		307 échantillons détectés positifs par la voie MSR V / XLD + 2 ^{ème} gélose d'isolement	
MSRV migré à 24h :	257 soit 78%	MSRV migré à 24h :	211 soit 69%
MSRV nég. à 24h et migré à 48h :	73 soit 22%	MSRV nég. à 24h et migré à 48h :	96 soit 31%

↳ La lecture du MSR V à 48h présente un intérêt non négligeable.

Lors de l'essai inter-laboratoire précédent en 2008, avec cette même souche de *S. Enteritidis*, les résultats positifs uniquement à 48 h d'incubation du MSR V étaient respectivement de 26% et 39% pour le niveau fort et le niveau intermédiaire.

Tableau 6 : Résultats des échantillons détectés positifs par la voie MSR V en fonction du niveau de contamination, de la durée d'incubation du MSR V et de la nature de la gélose d'isolement

Nombre d'échantillons	fiente + SE-100 MSR V pos à 24h	fiente + SE-100 MSR V pos à 48h	fiente + SE-100 MSR V pos (somme 24h & 48h)	fiente + SE-10 MSR V pos à 24h	fiente + SE-10 MSR V pos à 48h	fiente + SE-10 MSR V pos (somme 24 & 48h)
total	257	73	330	211	96	307
XLD + et 2 ^{ème} gélose +	249	73	322	201	93	294
XLD + et 2 ^{ème} gélose -	5	0	5 (22)	10	3	13 (22)
XLD - et 2 ^{ème} gélose +	3	0	3	0	0	0

↳ Pour cette souche de *Salmonella*, les colonies sont caractéristiques sur la gélose XLD, aussi une deuxième gélose d'isolement n'améliore pas la performance du protocole.

Cependant l'intérêt d'isoler le milieu d'enrichissement sur 2 géloses complémentaires est illustré ici par le

²² Pour 5 échantillons analysés par le même laboratoire, la 2ème gélose est la gélose de Rambach. L'isolement est pur.

fait que la souche *S. Enteritidis* de cet essai, forme des colonies orange/saumon –non caractéristique de *Salmonella* - sur la gélose Rambach. Le laboratoire a détecté les *Salmonella* en confirmant les colonies caractéristiques sur l'une des 2 géloses. C'est cette situation qui se produit pour détecter les souches de *Salmonella* ayant des caractères biochimiques atypiques (e.g. lactose⁺, LDC⁻). Les colonies sont alors seulement caractéristiques sur les géloses chromogènes et non sur XLD.

Cependant dans ce dernier cas l'attention doit se porter sur la présence ou non de migration sur la gélose MSR/V, surtout à 24h d'incubation et sur la présence d'une souche "pure" en isolement. De plus la connaissance des colonies formées par les souches particulières et/ou aux caractères biochimiques atypiques devrait inciter l'opérateur à effectuer les tests biochimiques de confirmation. Cette compétence de l'opérateur est une alternative à l'utilisation des géloses chromogènes souvent onéreuses.

Tableau 7 : Tableau : Résultats de la lecture du MSR/V et de la gélose XLD de 1023 échantillons analysés

(335 échantillons constitués de (fientes +SE100), 335 échantillons constitués de (fientes +SE10) et 353 échantillons constitués de (fientes +blanc).

Description de l'isolement sur la gélose XLD	MSRV: Migration à 24h puis isolement sur géloses ⁽²⁾			MSRV : Migration à 48h puis isolement sur géloses ⁽²⁾			MSRV : migration – ou ± à 48h et isolement sur géloses			pas de migration sur MSR/V et pas d'isolement		
	fiente + SE-100	fiente + SE-10	fiente + Blanc	fiente + SE-100	fiente + SE-10	fiente + Blanc	fiente + SE-100	fiente + SE-10	fiente + Blanc	fiente + SE-100	fiente + SE-10	fiente + Blanc
	259	211	16	73	108	69	1	4	45	2	12	223 ⁽¹⁾
colonies caractéristiques en isolement (presque) pure	184/184	139/139	0	34/34	58/58	0	0	0	0			
colonies suspectes en isolement (presque) pure	9/9	2/2	5 ⁽³⁾	11/11	6/6	0	0	0	0			
colonies caractéristiques + nombreuses colonies non caractéristiques – distinction facile	44/44	46/46	1	27/27	28/28	0	0	0	0			
colonies caractéristiques + nombreuses colonies non caractéristiques – distinction difficile	12/12	19/19	2	1/1	6/4 (2 sont XLD- et 2° gélose -)	4	0	0	2			
nombreuses colonies non caractéristiques de plusieurs types	5/0 (3 pos sur 2° gélose)	0	8	1	8/0 (0 pos sur 2° gélose)	48	1/0 (0 pos sur 2° gélose)	2/0 (0 pos sur 2° gélose)	19			
aucune colonie	0	0	0	0	0	9	0	0	0			
non renseigné	5/5	5/5	0	0	0	3	0	2/0 (0 pos sur 2° gélose)	20			
colonies non caractéristiques en petite quantité – un seul type			0			5			0			
Migration très légère et repiquage de précaution, à priori semblait négatif			0			0			4			

(1) 63% des échantillons non contaminés (223/353) ont été déclarés négatifs après lecture du MSR/V.

(2) Dans cet essai, 85 (soit 11.5%) des migrations nettes qui se sont produites en 24 ou 48h sur MSR/V, sont dues à d'autres espèces que *Salmonella*.

(3) 5 des 448 isollements (soit 1%) sur gélose XLD ayant l'aspect d'une culture pure ou presque, (les colonies étant suspectes) ne sont pas une culture de *Salmonella*. Aussi dans le cas d'une culture pure sur la gélose XLD, la souche sera le plus souvent une *Salmonella*. Et il est fortement recommandé de confirmer les colonies même si elles sont atypiques. Une *Salmonella* aux caractères biochimiques atypiques pourra être trouvée.

Parmi les 651 échantillons contaminés par la souche SE ayant donné une migration nette soit à 24h soit à 48h, 443 donnent un isolement (presque) pure sur XLD soit 68%. Et donc dans 68% des migrations observées sur la gélose MSR/V, la culture prélevée est supposée être uniquement une souche de salmonelle. A l'inverse, dans 32%, la culture prélevée en front de migration est mixte. Plus d'1 fois sur 4, effectuer les tests biochimiques et sérologiques sur la culture prélevée en front de migration serait une erreur du microbiologiste. Ne pas effectuer un isolement est un grand risque.

Figure 7 : Résultats des migrations sur la gélose MSR/V en fonction du niveau de contamination en *Salmonella*

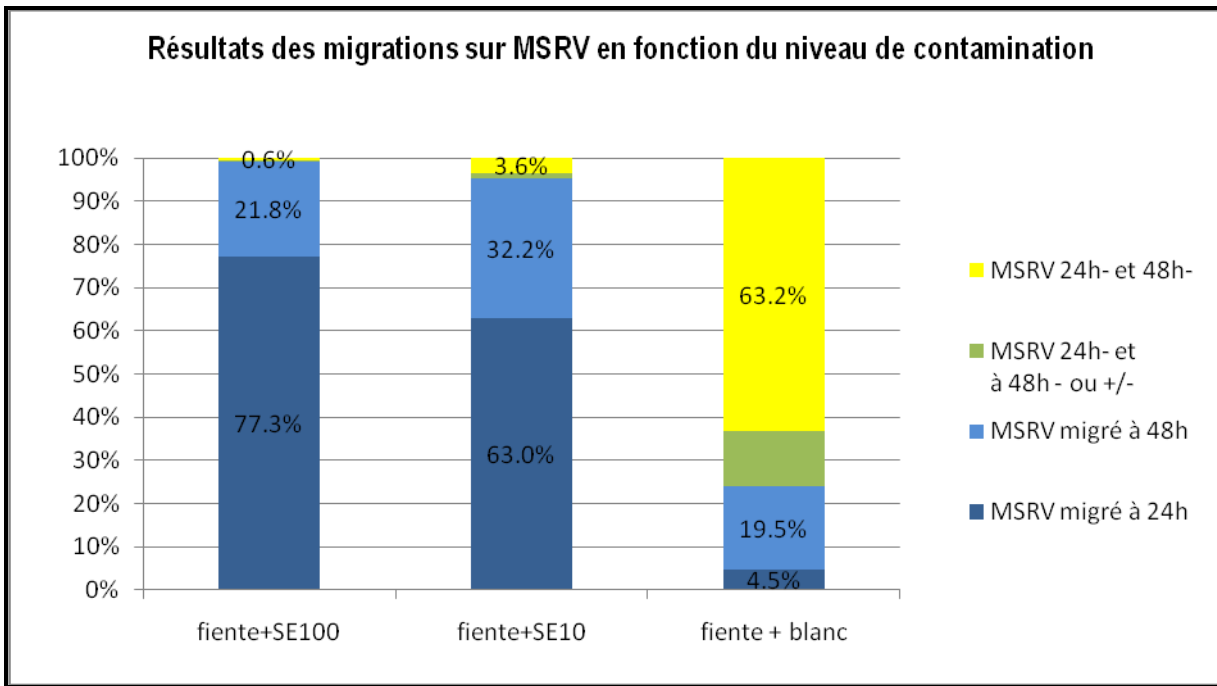
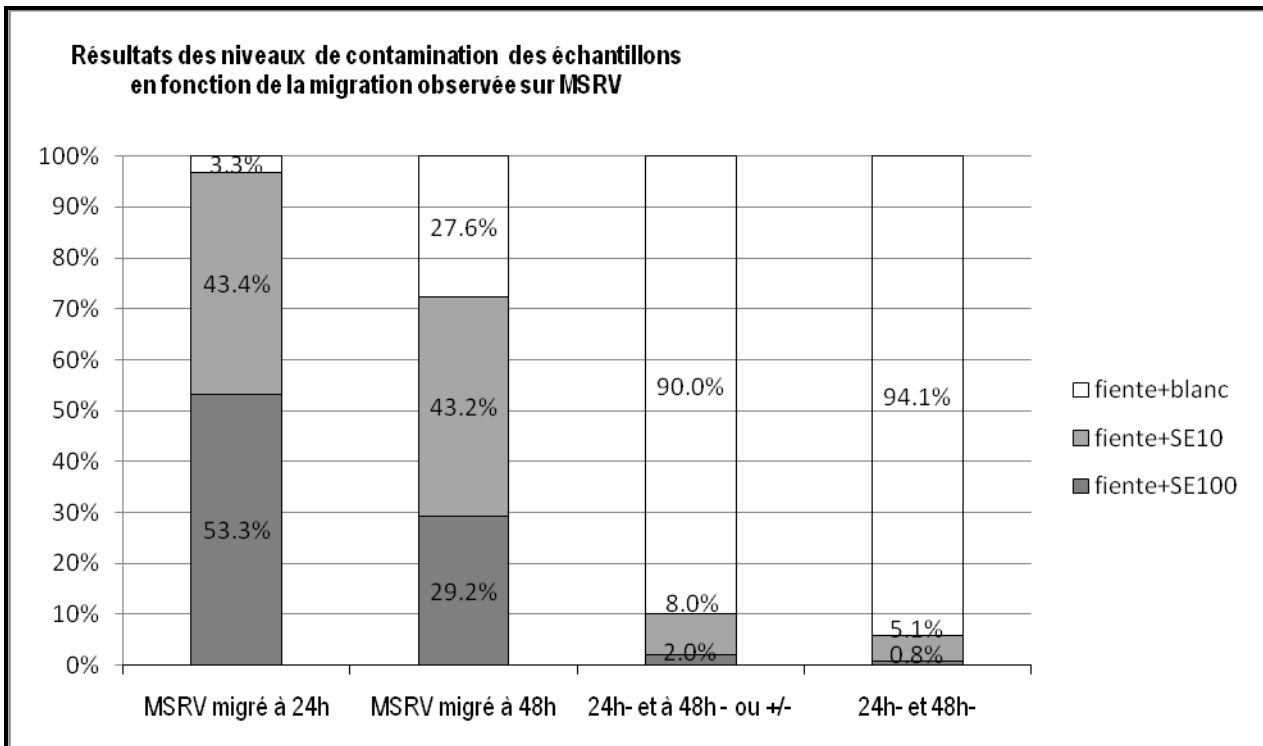
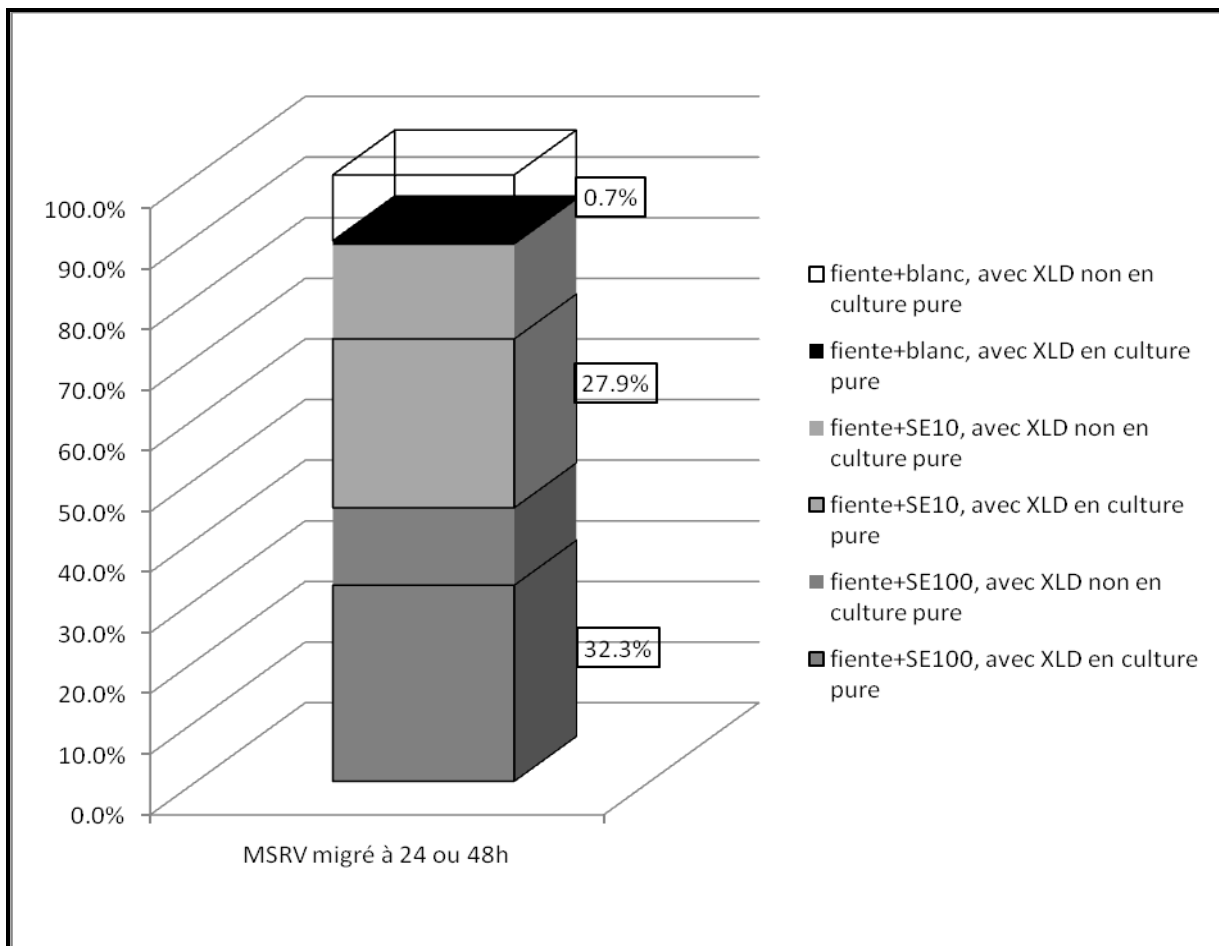


Figure 8 : Niveaux des contaminations par *S. Enteritidis* en fonction de la migration observée sur MSR/V



Ce graphique permet d'estimer le risque de se tromper quand l'analyste donne une présomption de résultats dès la lecture des MSR/V, soit 2 à 3 jours après le début des analyses, par exemple lorsque le client est pressé de connaître le statut du troupeau avant le départ pour l'abattoir.

Figure 9 :Niveaux des contaminations par *S. Enteritidis* en fonction de la culture obtenue sur la gélose XLD



Si on admet que la culture obtenue sur la gélose d'isolement XLD est le reflet de la culture qui a essaimé sur MSR/V, cette figure montre que la culture qui essaime à partir du point d'inoculation est soit constituée de la seule culture de *Salmonella*, soit du mélange de *Salmonella* avec d'autres espèces, mais aussi que d'autres espèces sont capables d'essaimer en l'absence de *Salmonella*, en culture pure ou en mélange.

L'essaimage d'une culture pure ne s'est produit que dans 60.9% des cas de MSR/V migré pour l'ensemble des participants. Il aurait été alors possible, de pratiquer les tests de confirmation biochimique et sérologiques directement à partir de la culture en front de migration. Aussi un résultat fiable ne peut être obtenu qu'après les quatre phases de la norme –pré-enrichissement, enrichissement, isolement et confirmation.

4 Discussion = Evaluation de la campagne

4.1 Fonctions logistiques d'accompagnement des essais

Les laboratoires agréés et reconnus par la DGAL ont été nommés après le lancement de cette campagne. Tous ont pu y participer.

Les échanges entre le LNR et les laboratoires par courriel n'ont pas été satisfaisants. Certains messages n'ont pas été reçus. La cause n'est pas connue. Aussi l'envoi individuel sur support papier reste obligatoire, au moins un accusé de réception.

La saisie des données dans le formulaire sur EXCEL avec une liste de réponses imposées est satisfaisante pour les participants. Et la synthèse des données demande moins de temps à l'organisateur. Les erreurs identifiées et les imprécisions du formulaire seront corrigées. Afin d'éviter les réponses incohérentes, les définitions des termes utilisés devront être données.

Les modalités d'acheminement des colis sont compatibles avec la stabilité des lenticules.

4.2 Les échantillons

Le milieu de Amies n'a pas été ajouté à la matrice fiente. Et un autre type de conditionnement a été utilisé pour l'envoi des fientes congelées. Le nombre d'incidents (fuites) est limité. Cette préparation est jugée satisfaisante. Les fientes de dindes semblent convenir en alternative à celles de poulet, plus difficile à recueillir en grande quantité.

La contamination artificielle par les lenticules permet de disposer d'un matériel qui ne nécessite pas son transport sous régime réfrigéré, et pour lequel le nombre de *Salmonella* par lenticule est mieux maîtrisé. Il peut être déterminé par dénombrement sur gélose et pour plusieurs dizaines de répétitions. Les lots de lenticules ont une homogénéité satisfaisante, même pour les faibles nombre de *Salmonella*.

Par contre les *Salmonella* contenues dans les lenticules ne sont pas dans les conditions physiologiques de la flore apportée par les fientes. Il est nécessaire d'inclure une phase de revivification lors de leur préparation avant l'ajout à la matrice. Cette préparation est particulière et diffère complètement des préparations d'échantillons reçus quotidiennement par les laboratoires de contrôle. Ce qui a désorienté quelques participants.

La souche SE présente dans les lenticules est une souche issue de collection. Elle présente des caractères particuliers par rapport aux souches du terrain ; les colonies sur gélose Rambach sont saumon (elles n'hydrolysent pas le propylène glycol - comme les colonies de *S. Gallinarum*) au lieu d'être rose-fuchsia.

Le nombre total d'échantillons, environ une vingtaine, et les 3 niveaux de contamination recommandés par le groupe de travail ISO sur les essais interlaboratoires d'aptitude, ne permet d'inclure qu'une matrice et une souche de *Salmonella*. Dans cet EIL, le sérovar SE a été conservé par rapport au précédent EIL, mais la matrice a été modifiée.

4.3 Les milieux utilisés par les laboratoires

Les vérifications de la concordance des compositions décrites dans la norme NF U47-100 restent de la responsabilité des laboratoires accrédités.

Les tableaux inclus dans ce rapport peuvent être une aide et sont fournis en cette fin.

4.4 Les résultats des laboratoires selon les 2 normes NF U47-100: février 2007 et NF U47-100 adaptée

A la suite des deux sessions, les critères de performances sont atteints par tous les laboratoires.

4.5 L'ensemble des résultats

Le seuil de détection (souvent appelé par les microbiologistes «sensibilité de la méthode») des méthodes de recherche de *Salmonella* dépend de la matrice, de la flore annexe, du sérovar. Pour cette zone seuil, le pourcentage de résultats positifs croît de 0 à 100% en fonction du nombre croissant de *Salmonella* présent dans l'échantillon.

La sensibilité calculée pour le niveau appelé intermédiaire (10 SE contaminant 10 g de fiente) est >90%. Au regard des résultats obtenus dans cette campagne, et pour cette association matrice/souche, le seuil de sensibilité de la méthode NFU 47-100 apparaît inférieur à 10 SE dans 10 g. Lors d'une prochaine campagne, le niveau choisi devrait être diminué pour s'approcher de celui pour lequel la sensibilité de la méthode est de 50%. Mais il faudrait auparavant s'assurer que les résultats rapportés ont été obtenus dans des conditions des analyses de routine, et qu'ils ne sont pas la synthèse des résultats obtenus à la suite de comparaison de milieux ou d'opérateurs.

Remerciements

Je remercie les personnes de l'unité HQPAP du LERAPP pour l'aide apportée lors de l'organisation de cette campagne

Je remercie également les laboratoires participants.

Tous mes remerciements à Philippe FRAVALO pour ses conseils de rédaction

Références

les rapports rédigés par le LCR-Salmonella et référencés en notes de bas de page N° 9 ,10, 11 peuvent être consultés sur le site «www.rivm.nl/crlsalmonella/publications»

Liste des figures concernant les Résultats des analyses

<i>Figure 1 : Résultats des échantillons-tests contaminés par S. Enteritidis au niveau fort (SE-100) obtenus par les laboratoires codés 1 à 38</i>	21
<i>Figure 2 : Résultats des échantillons-tests contaminés par S. Enteritidis au niveau intermédiaire (SE-10) obtenus par les laboratoires codés 1 à 38</i>	21
<i>Figure 3 : Résultats des échantillons-tests contaminés par S. Enteritidis au niveau fort (SE-100) obtenus par les laboratoires codés 39 à 84</i>	22
<i>Figure 4 : Résultats des échantillons-tests contaminés par S. Enteritidis au niveau intermédiaire (SE-10) obtenus par les laboratoires codés 39 à 84</i>	22
<i>Figure 5 : Comparaison des résultats obtenus par les 71 laboratoires pour les 5 échantillons artificiellement contaminés avec les lenticules SE 100</i>	24
<i>Figure 6 : Comparaison des résultats obtenus par les 71 laboratoires pour les 5 échantillons artificiellement contaminés avec les lenticules SE 10</i>	24
<i>Figure 7 : Résultats des migrations sur la gélose MSR/V en fonction du niveau de contamination en Salmonella</i>	31
<i>Figure 8 : Niveaux des contaminations par S. Enteritidis en fonction de la migration observée sur MSR/V</i>	31
<i>Figure 9 : Niveaux des contaminations par S. Enteritidis en fonction de la culture obtenue sur la gélose XLD</i>	32

Liste des tableaux concernant les Résultats des analyses

<i>Tableau 1 : Résultats des échantillons-Contrôles obtenus par les 71 laboratoires</i>	20
<i>Tableau 2 : Tableau : Spécificité, sensibilité, et justesse de la méthode pour des échantillons-contrôles : lenticules contenant ou non la souche S. Enteritidis NCTC 6676, en absence de fiente Résultats des 71 participants</i>	25
<i>Tableau 3 : Tableau : Spécificité, sensibilité, et justesse de la méthode pour des échantillons-tests : lenticules contenant ou non la souche S. Enteritidis NCTC 6676, en présence de 10 g de fiente Résultats des 71 participants</i>	25
<i>Tableau 4 : Nombre de résultats positifs et négatifs en fonction de la norme</i>	28
<i>Tableau 5 : Nombre de résultats positifs en fonction de la durée d'incubation de la gélose MSR/V</i>	28
<i>Tableau 6 : Résultats des échantillons détectés positifs par la voie MSR/V en fonction du niveau de contamination, de la durée d'incubation du MSR/V et de la nature de la gélose d'isolement</i>	28
<i>Tableau 7 : Tableau : Résultats de la lecture du MSR/V et de la gélose XLD de 1023 échantillons analysés</i>	30