



Méthodes alternatives d'analyse pour l'agroalimentaire
Performances analytiques certifiées

ATTESTATION DE VALIDATION DE METHODE ALTERNATIVE D'ANALYSE
SUIVANT LA NORME NF EN ISO 16140 : 2003

N° attestation : UNI 03/06 - 12/07

Date de validation : 04.12.2007

Fin de validité : 04.12.2011

La Société OXOID Ltd
(siège social Wade Road
et site de RG24 8 PW BASINGSTOKE
production) UK

Distributeur OXOID Thermofisher
6 route de Paisy
69571 DARDILLY CEDEX
France

est autorisée à faire référence à la marque **AFNOR VALIDATION** pour la méthode alternative qualitative d'analyse ci-dessous :

Salmonella Precis™

Référence du protocole : INH 12/2007

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine et animale et prélèvements d'environnement (hors production primaire).

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune

METHODE DE REFERENCE

NF EN ISO 6579, 2002 : Méthode horizontale pour la recherche de *Salmonella spp*

Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN

AFAQ AFNOR Certification

Siège : 11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France

Bureaux : 116, avenue Aristide Briand – BP 40 – 92224 Bagneux Cedex 6 – France

Tél +33 (0)1 46 11 37 00 – Fax +33 (0)1 46 11 39 40

certification@afaq.afnor.org - www.afnor-validation.org

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode Salmonella Precis™ comprend un enrichissement en bouillon sélectif ONE BROTH Salmonella, suivi d'un isolement sur gélose Brilliance™ Salmonella. La technologie Salmonella Precis™ a pour objet une inhibition très sélective de la flore.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode Salmonella Precis™ doivent être confirmés au moyen de l'une des options suivantes:

- à partir des colonies isolées sur gélose Brilliance™ Salmonella, selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN, l'ISO ou l'AFNOR (en incluant l'étape de purification).
- par identification directe à partir des colonies isolées sur gélose Brilliance™ Salmonella, en mettant en œuvre le test Salmonella latex. Un réisolement doit être effectué en parallèle pour vérifier la pureté du microorganisme.

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé par l'une des options décrites ci-dessus), le laboratoire devra mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

EXACTITUDE relative, SPECIFICITE relative, SENSIBILITE relative Comparaison des performances de la méthode alternative et de la méthode de référence

Des essais ont été effectués en 2007 sur 424 échantillons de produits dont 72 naturellement contaminés, 144 artificiellement contaminés et 208 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits laitiers, produits carnés, produits végétaux et produits de la mer et divers, ovoproduits, aliments pour animaux, prélèvements d'environnement.

Tous les échantillons ont été analysés **en simple** par les **deux méthodes**.

Tableau de résultats (Cf. tableau 1 de la norme NF EN ISO 16140) :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 178 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 18 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 20 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 208 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

(3) dont 5 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

Les pourcentages obtenus, par rapport à la méthode de référence, sont les suivants :

- Exactitude relative : **AC = 91,0%**
- Spécificité relative : **SP = 92,0%**

Note : une spécificité relative inférieure à 100% résulte d'un nombre de positifs supplémentaires confirmés et non pas de faux positifs

- Sensibilité relative : **SE = 89,9%**

La **sensibilité** a également été recalculée en tenant compte de l'ensemble des positifs confirmés (ceci inclut les positifs supplémentaires de la méthode alternative) :

Méthode alternative :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 90,7\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 91,7\%$$

Analyse des discordants (selon l'annexe F de la norme EN ISO 16140)

PD = 18 , ND = 20 ; Y = PD + ND = 38 donc Y > 18

Utilisation du test de Mc Nemar : $d = |PD - ND| = 2$ $\chi^2 = d^2/Y = 0,105$ et $0,105 < 3,841$

Conclusion

Les deux méthodes ne sont pas différentes en termes statistiques.

Conservation des bouillons One Broth Salmonella pendant 72 heures à 4°C

Une étude sur la conservation du bouillon One broth Salmonella a été faite sur (226) échantillons. Les résultats ne sont pas modifiés par cette conservation.

NIVEAU DE DETECTION relatif

Comparaison des performances de la méthode alternative et de la méthode de référence

Des essais ont été effectués en 2007, sur les 6 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : produits laitiers, produits carnés, produits végétaux et produits de la mer et divers, ovoproduits, aliments pour animaux, prélèvements d'environnement.

Les produits ont été analysés **6 fois**, par les **deux méthodes**, à **4 niveaux** de contamination.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Matrice	Souche	Niveau de détection relatif LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Escalope de dinde crue	<i>Salmonella typhimurium</i>	0,3 [0,5 - 0,9]	0,2 [0,3 - 0,7]
Lait cru	<i>Salmonella anatum</i>	0,3 [0,5 - 0,8]	0,3 [0,4 - 0,7]
Salade	<i>Salmonella enteritidis</i>	0,1 [0,2 - 0,6]	0,4 [0,1 - 0,5]
Coule d'œuf	<i>Salmonella enteritidis</i>	0,4 [0,2 - 1,0]	0,4 [0,2 - 1,1]
Croquettes pour chien	<i>Salmonella anatum</i>	0,1 [0,2 - 0,4]	0,2 [0,3 - 0,7]
Eau de process	<i>Salmonella give</i>	0,2 [0,4 - 1,4]	0,3 [0,7 - 1,8]

(3) **LOD₅₀** : estimation du niveau de contamination qui permet d'obtenir une détection positive par la méthode alternative dans 50% des cas

"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

Les niveaux de détection de la méthode alternative et de la méthode de référence sont identiques et se situent entre 0,1 et 1,8 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 52 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 53 testées. Une souche *Salmonella dublin* ne s'est pas développée en bouillon One broth *Salmonella*.
- L'étude de 40 souches non *Salmonella* a mis en évidence la présence de réactions sur gélose OSCMII pour 2 souches (*Citrobacter diversus* et *Enterobacter sakazakii*) mais ces souches donnent une réaction négative au test latex.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 2 jours (si confirmation latex) ou 4 jours (si confirmation classique) avec la méthode alternative contre 5 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours avec la méthode alternative contre 3 jours avec la méthode de référence.
 - Dans le cas de résultats présumés **positifs** par la méthode alternative, mais rendus **négatifs après confirmation**, les résultats négatifs sont obtenus en 2 à 4 jours

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2007 avec 13 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé demi-écrémé, contaminés artificiellement avec une souche de *Salmonella typhimurium* aux 3 niveaux suivants :

- niveau 0
- niveau 5 UFC/25 ml
- niveau 25 UFC/25 ml

Les laboratoires ont testé, par les **deux méthodes**, **8 réplicats** pour **chaque niveau** de contamination, soient 24 analyses au total par laboratoire participant.

Résultats :

Niveaux de contamination	Nombre total d'échantillons	Nombre d'échantillons analysés	Nombre de résultats exploités*	Nombre de résultats négatifs		Nombre de résultats positifs	
				REF	ALT	REF	ALT
0	104	104	96	96	95	0	1
1	104	104	96 (REF) /95 (ALT)	0	0	96	95 ^(a)
2	104	104	96	0	0	96	96

* Un laboratoire a obtenu un résultat positif par la méthode de référence sur 4 échantillons non inoculés : ses résultats ont été retirés de l'interprétation.

(a) Un laboratoire s'est trompé dans la dilution d'un échantillon destiné à l'analyse par la méthode alternative : cet échantillon n'a pas été pris en compte dans l'interprétation

Calculs

- L'exactitude relative est de **99,7%**
- La spécificité est de **100%**
- La sensibilité est de **100%**

Interprétation

Les résultats de l'étude collaborative sont comparables à ceux obtenus lors de l'étude préliminaire.

La **sensibilité** a également été recalculée en tenant compte de l'ensemble des positifs confirmés (ceci inclut les positifs supplémentaires de la méthode alternative) :

Méthode alternative :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 100\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 99,5\%$$

Degré d'accord, concordance et odds ratio :

Degré d'accord : % de chance de trouver le même résultat pour deux échantillons identiques analysés par le même laboratoire dans des conditions de répétabilité. C'est la moyenne des probabilités que deux répliqués donnent le même résultat pour chaque laboratoire.

Concordance : % de chance de trouver le résultat pour deux échantillons identiques analysés dans deux laboratoires différents (conditions de reproductibilité). C'est le % de toutes les paires de répliqués donnant le même résultat.

Odds ratio (COR) : il est défini par la formule suivante :

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

Le tableau suivant indique les valeurs pour la **méthode alternative** :

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	98	99	1,0
L1	100	100	1,0
L2	100	100	1,0

Le tableau suivant indique les valeurs pour la **méthode de référence** :

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100	100	1,0
L1	100	100	1,0
L2	100	100	1,0

Conclusion

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

Il est souhaitable d'adresser à AFAQ AFNOR Certification toute réclamation concernant les performances de la méthode validée

AFAQ AFNOR Certification tient à votre disposition un document de synthèse des études préliminaire et collaborative