



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

**ATTESTATION DE VALIDATION DE METHODE ALTERNATIVE D'ANALYSE
SUIVANT LA NORME V 03-100**

N° attestation : TEC – 24/3 – 12/03

**Date de validation : 12.12.2003
Fin de validité : 12.12.2007**

La Société **TECRA INTERNATIONAL Pty Ltd**
(siège social) 13 Rodborough Road
et site de FRENCHS FOREST NSW 2086
production) AUSTRALIE

Distributeur **BIOTRACE SA**
ZI du Val de Seine
20 avenue Marcellin Berthelot
92396 Villeneuve la Garenne
FRANCE

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

Référence de la méthode :

TECRA® UNIQUE SALMONELLA

Référence du protocole : MS 2427 07/05

PRINCIPE DE LA METHODE

Le test TECRA® UNIQUE SALMONELLA est basé sur une réaction immuno-enzymatique permettant la détection des salmonelles mobiles et immobiles. Après un pré-enrichissement en eau peptonnée tamponnée, les salmonelles de l'échantillon sont capturées par des anti-corps hautement spécifiques répartis sur un bâtonnet, le « dipstick ». Après lavage puis enrichissement, une réaction ELISA est appliquée. En présence de salmonelles, une coloration pourpre apparaît sur les trois derniers quarts du bâtonnet, le premier quart servant de contrôle négatif.

Dans le cadre de la Validation AFNOR, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode validée AFNOR doivent être confirmés à partir du bouillon d'enrichissement selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN, l'ISO ou l'AFNOR (en incluant l'étape de purification).

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine et animale

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI : aucune

METHODE(S) DE REFERENCE

NF EN ISO 6579 (2002) – Microbiologie des aliments - 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.fr

PRATICABILITE

- L'obtention des résultats **positifs** (incluant l'étape de confirmation) se fait en 4 à 6 jours avec le kit TECRA® UNIQUE SALMONELLA contre 5 à 7 jours avec la méthode de référence.
- L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 1 journée avec le kit TECRA® UNIQUE SALMONELLA contre 5 à 7 jours avec la méthode de référence.
- Les résultats positifs par la méthode TECRA® UNIQUE SALMONELLA avec confirmation négative par la méthode de référence sont obtenus en 4 à 6 jours.

SPECIFICITE

La spécificité a été étudiée dans le cadre de la validation AOAC RI :

- Les 100 souches de *Salmonella* ont été retrouvées positives par le kit TECRA® UNIQUE SALMONELLA.
- Sur 31 souches non-*Salmonella*, 29 étaient négatives et deux n'ont pas pu être testées (absence de pousse sur MBPW à 37°C).

Etude complémentaire :

- 7 souches de *Salmonella* ont été détectées positives sur les 7 souches testées (*S. Pullorum* et quelques *S. spp* issues de produits alimentaires).
- L'étude de 4 souches n'appartenant pas au genre *Salmonella* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées (sur *Enterobacter* et *Citobacter*).

LIMITE DE DETECTION INTRINSEQUE

La limite de détection intrinsèque, a été déterminée à l'aide des 4 souches pures de *Salmonella* suivantes : *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. virchow* et *S. infantis*.

Le nombre de salmonelles à introduire pour obtenir une réponse positive avec la méthode TECRA® UNIQUE SALMONELLA, est de 10^4 à $5,0 \cdot 10^6$ cellules/mL.

LIMITE DE DETECTION

Une étude a été réalisée en 2003 sur 4 matrices (lait cru, viande de bœuf hachée, œufs entiers, crème pâtissière au chocolat), contaminés artificiellement chacun par 4 souches de salmonelles (*enteritidis*, *typhimurium*, *virchow* et *infantis*), à 5 niveaux de contamination : 0, 1-10, 2-20, 5-50, 10-100 UFC/25 g.

Les produits ont été analysés en double par le test TECRA® UNIQUE SALMONELLA et par la méthode de référence.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Niveau de contamination attendu en UFC/25g	Niveau réel UFC/25g	Méthode alternative nombre d'échantillons détectés	Méthode de référence nombre d'échantillons détectés
0	0	0 %	0 %
1 à 10	3 – 8	91 %	97 %
2 à 20	7 – 18	100 %	100 %
5 à 50	14 – 35	100 %	100 %
10 à 100	37 - 67	100 %	100 %

Conclusion

La limite de détection de la méthode se situe entre 3 et 8 UFC/25 g.

JUSTESSE

Comparaison des performances de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence

Des essais ont été effectués en 2003 sur 261 échantillons de produits dont 34 naturellement contaminés, 96 produits artificiellement contaminés et 131 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : produits carnés, produits de la mer, ovoproduits, produits laitiers et produits d'alimentation animale.

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

Les résultats sont les suivants :

- Positifs supplémentaires méthode alternative : 1
- Faux négatifs : 2
- Concordants : 258

Conclusion

Le taux de concordance entre la méthode de référence et la méthode TECRA® UNIQUE SALMONELLA est de 98,85 %.

FIDELITE

Les valeurs de fidélité ont été déterminées au cours d'un essai effectué en 2003 comprenant 14 laboratoires. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, de viande hachée et crème dessert au chocolat, contaminés artificiellement avec les souches de sérotype *Salmonella enteritidis* (lait et viande) et *Salmonella virchow* (crème dessert) aux 4 niveaux suivants : 0, 1-10, 5-50, 10-100 cellules/25 mL.

Les laboratoires ont testé, en double, un échantillon pour chaque niveau de contamination, selon trois protocoles.

Les résultats par niveau de contamination et par matrice sont les suivants :

Matrice lait :

Niveaux (cellules / 25g)	Nombre total d'échantillons	Nombre d'échantillons analysés*	Nombre de résultats exploités*	Nombre de résultats négatifs	Nombre de résultats positifs
0	28	24	22	22	0
1 à 10	28	24	22	0	22
5 à 50	28	24	22	0	22
10 à 100	28	24	22	0	22

* 2 laboratoires n'ont pas réalisé les analyses et les résultats d'un 3^{ème} laboratoire n'ont pas été pris en compte à cause de défaut d'organisation et de température de réception trop élevée.

Le pourcentage de concordance avec les résultats attendus est de 100 %.

Matrice viande hachée :

Niveaux (cellules / 25g)	Nombre total d'échantillons	Nombre d'échantillons analysés*	Nombre de résultats exploités*	Nombre de résultats négatifs	Nombre de résultats positifs
0	28	24	22	21	1
1 à 10	28	24	22	0	22
5 à 50	28	24	22	0	22
10 à 100	28	24	22	0	22

* 2 laboratoires n'ont pas réalisé les analyses et les résultats d'un 3^{ème} laboratoire n'ont pas été pris en compte à cause de défaut d'organisation et de température de réception trop élevée.

Le pourcentage de concordance avec les résultats attendus est de 98,9 %.

Matrice crème dessert au chocolat :

Niveaux (cellules / 25g)	Nombre total d'échantillons	Nombre d'échantillons analysés*	Nombre de résultats exploités*	Nombre de résultats négatifs	Nombre de résultats positifs
0	28	24	24	23	1
1 à 10	28	24	24	0	24
5 à 50	28	24	24	0	24
10 à 100	28	24	24	0	24

* 2 laboratoires n'ont pas réalisé les analyses à cause de défaut d'organisation et de température de réception trop élevée.

** Cet échantillon négatif trouvé positif par le kit a bien été confirmé positif par isolement sur milieux sélectifs gélosés

Le pourcentage de concordance avec les résultats attendus est de 98,9 %.

Conclusion

Le pourcentage de concordance globale avec les résultats attendus est de 99,6 %.
La méthode est fidèle.

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