

CONFIDENTIEL

ETUDE DE RECONDUCTION SELON LA NORME ISO 16140 DE
LA VALIDATION AFAQ AFNOR CERTIFICATION
DU TEST 3M TECRA ULTIMA *SALMONELLA*
POUR LA DETECTION RAPIDE DES SALMONELLES DANS LES
PRODUITS D'ALIMENTATION HUMAINE ET ANIMALE

Rapport de synthèse

Ce rapport d'analyse ne concerne que les objets soumis aux analyses. Sa reproduction n'est autorisée que sous forme de fac-similé photographique intégral. Il comporte 21 pages.

Seuls certains essais rapportés dans ce document sont couverts par l'accréditation de la Section Laboratoire du COFRAC. Ils sont identifiés par le symbole (*)

Essais réalisés à l'ISHA : 25, avenue de la République 91300 Massy

Fabricant : **3M Australia Pty Ltd**

3 Rodborough Rd
Frenchs Forest, New South
Wales, 2086, AUSTRALIA

Responsable de l'étude : **3M Santé**

Département microbiologie
Boulevard de l'Oise
95029 Cergy-Pontoise Cedex

Laboratoire expert : **I. S. H. A.**

25, avenue de la République
91300 MASSY

En vue de la reconduction de la validation AFAQ AFNOR
Certification selon la norme NF EN ISO 16140
du test 3M Tecra Ultima *Salmonella*
pour la détection des salmonelles avec confirmation.

1 – INTRODUCTION	4
1.1 Objectif.....	4
1.2 Méthode alternative	4
1.3 Méthode de référence (*).....	5
1.4 Domaine d'application.....	6
2 – RAPPEL DES RESULTATS DE VALIDATION OBTENUS EN 2003	7
2.1 Etude préliminaire	7
2.2 Etude collaborative.....	7
3 – ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	7
3.1 Autres validations	7
3.2 Publications	8
3.3 Bilan des réclamations utilisateurs	8
4– ETUDE PRELIMINAIRE (ETUDE DE RECONDUCTION) ET ESSAIS COMPLEMENTAIRES	8
4.1 Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative de la méthode alternative et de la méthode de référence	8
4.1.1 <u>Nombre et nature des échantillons</u>	8
4.1.2 <u>Protocole d'essai</u>	9
4.1.3 <u>Résultats</u>	9
4.2 Niveau de détection relatif de la méthode alternative et la méthode de référence.....	12
4.2.1 <u>Protocole d'essai</u>	12
4.2.2 <u>Résultats</u>	12
4.2.3 <u>Conclusion</u>	12
4.3 Sélectivité.....	12
4.3.1 <u>Protocole d'essai</u>	13
4.3.2 <u>Résultats</u>	13
4.3.3 <u>Conclusion</u>	13
4.4 Conservation du bouillon thermisé	13
5 – ETUDE COLLABORATIVE	13
5.1 Mise en oeuvre de l'étude collaborative	13
5.1.1 <u>Laboratoires collaborateurs</u>	13
5.1.2 <u>Vérification de l'absence de <i>Salmonella</i> spp dans la matrice utilisée</u>	13
5.1.3 <u>Stabilité de la souche dans la matrice lait pasteurisé</u>	13
5.1.4 <u>Préparation et inoculation des échantillons</u>	14
5.1.5 <u>Etiquetage des échantillons</u>	14
5.1.5 <u>Expédition des échantillons</u>	15
5.1.6 <u>Réception et analyse des échantillons par les laboratoires collaborateurs</u>	15
5.2 Résultats.....	15
5.2.1 <u>Température et état des échantillons à réception</u>	15
5.2.2 <u>Dénombrements de la flore totale</u>	16
5.2.3 <u>Résultats du laboratoire expert</u>	16
5.2.4 <u>Résultats des laboratoires collaborateurs</u>	16
5 - CONCLUSION GENERALE	21

1 – INTRODUCTION

Le test 3M Tecra Ultima *Salmonella* a été validé en 2003 selon l'ancien référentiel relatif aux études préliminaire et collaborative pour la validation AFNOR des méthodes alternatives (révision 7).

Deux modifications mineures ont été opérées sur le test : le changement du type de matériau pour le flaconnage et le remplacement du substrat ABTS par le substrat TMB.

1.1 Objectif

Cette étude de recondution a pour but d'évaluer les performances du test 3M Tecra Ultima *Salmonella* par rapport à la méthode de référence pour l'ensemble des produits d'alimentation humaine et animale selon la norme NF EN ISO 16140.

Les caractéristiques suivantes sont étudiées :

- Détermination de l'exactitude relative, sensibilité relative et spécificité relative de la méthode alternative et de la méthode de référence,
- Détermination du niveau de détection relatif de la méthode alternative et de la méthode de référence,
- Etude de la sélectivité de la méthode alternative (inclusivité).

Remarque : pour l'évaluation de AC, SE et SP, les données de validation 2003 ont été utilisées avec un complément d'essais.

1.2 Méthode alternative

Le test 3M TECRA Ultima *Salmonella* est une méthode rapide et spécifique pour la détection des salmonelles dans les produits alimentaires (alimentations humaine et animale); il est basé sur une réaction immuno-enzymatique de type «sandwich» utilisant des anticorps spécifiques de haute affinité anti-salmonelles.

Ce test nécessite une étape de pré-enrichissement sur milieu non-sélectif (eau peptonée tamponnée) et un enrichissement sélectif (Rappaport Vassiliadis Soja).

En cas de présence de salmonelles, les antigènes présents dans les milieux d'enrichissement se fixent aux anticorps adsorbés à la surface des puits de la microplaque. Après 3 lavages destinés à éliminer les substances résiduelles, on ajoute des anticorps spécifiques marqués par une enzyme qui dégrade le substrat en donnant une coloration bleue. Cette réaction ne peut avoir lieu en l'absence de salmonelles. La coloration est visible à l'œil nu.

FIGURE 1 : Protocole de la méthode alternative

ETAPE 1 : PRE-ENRICHISSEMENT

Prise d'essai de X g (mL) + 9X mL d'eau peptonée tamponnée
Incubation (37 ± 1) °C de 16 à 20 heures

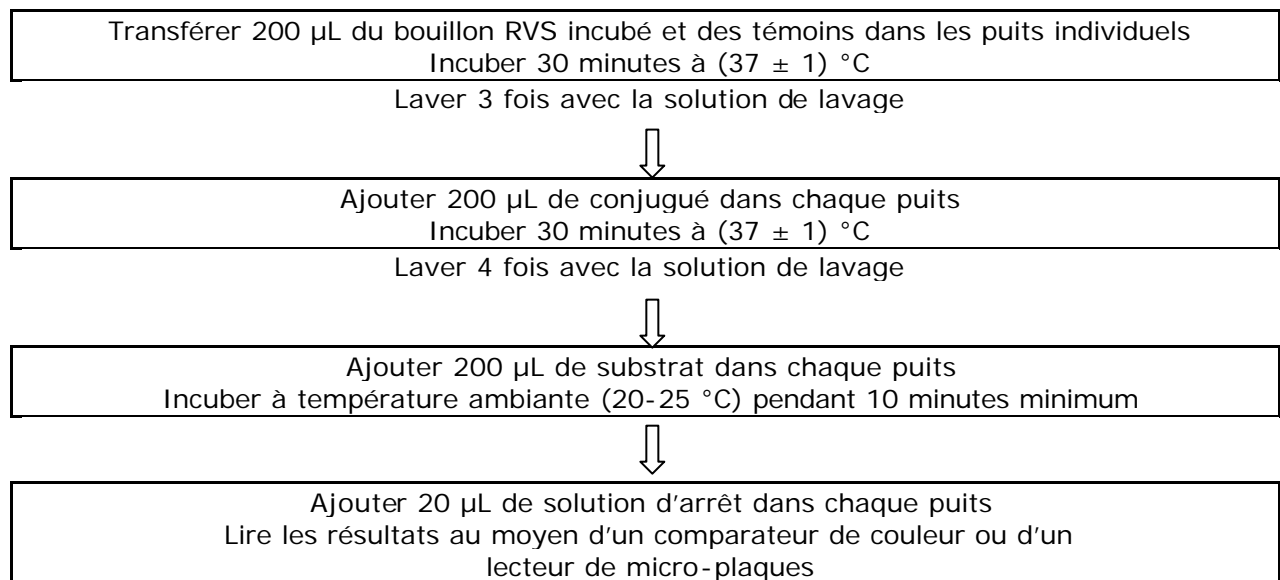
ETAPE 2 : ENRICHISSEMENT

Transfert de 0.1 mL de la suspension mère dans 10 mL de bouillon
Rappaport-Vassiliadis Soja (RVS)
Incubation ($41,5 \pm 1$) °C de 18 à 24 heures

ETAPE 3 : TRAITEMENT THERMIQUE

Ajouter 25 µL d'un 'additif' dans un tube fourni et transférer 1 mL du bouillon RVS dans ce tube.
Appliquer un traitement de 75 °C – 100 °C pendant 15 minutes (bains marie ou à sec)

ETAPE 4 : REACTION ELISA



L'essai est valide si :

La D.O. du témoin positif est = 1,0 ET la D.O. du témoin négatif est = à 0,2.

Le résultat est considéré négatif, si la D.O. est < à 0,2

Le résultat est considéré comme présomptif positif, si la D.O. est = à 0,2

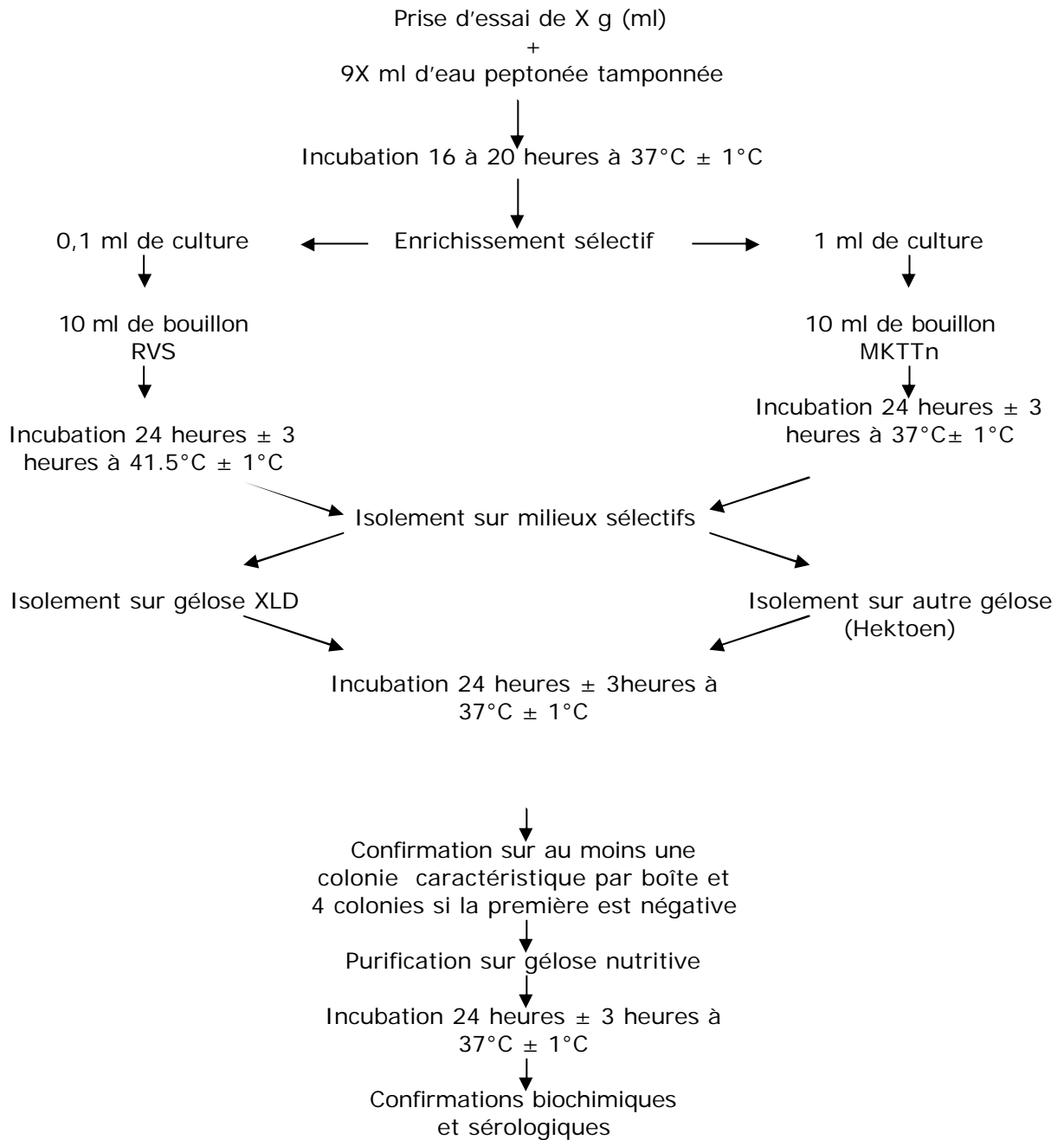
Pour la lecture visuelle se conférer au comparateur de couleur.

Confirmation d'un résultat présumé positif

La confirmation doit être réalisée à partir du bouillon RVS non chauffé par un isolement sur milieux sélectifs en suivant la méthode de référence.

1.3 Méthode de référence (*)

Norme NF EN ISO 6579 (2002), méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp a été utilisée pour l'étude comparative.

FIGURE 2 : Protocole de la méthode de référence

1.4 Domaine d'application

Tous produits d'alimentation humaine et animale.

2 – Rappel des résultats de validation obtenus en 2003

2.1 Etude préliminaire

Etude de justesse

Au total 262 échantillons ont été analysés par les 2 méthodes dont 25.19% des échantillons positifs étaient contaminés naturellement.

Le pourcentage de concordance entre les 2 méthodes est de 98.47, dû à 2 résultats faux négatifs (1 échantillon de mayonnaise contaminé à raison de 5 cellules de *S. Virchow* par 25 grammes et un échantillon de fromage type camembert contaminé à raison de 2 cellules par 25 grammes avec la même souche) et 2 résultats positifs supplémentaires (1 échantillon de viande de dinde contaminé à raison de 4 cellules de *S. Virchow* par 25 grammes et un échantillon de coule d'œuf contaminé naturellement). Tous les résultats positifs ont été confirmés.

Résultat pour l'ensemble des catégories

METHODE DE REFERENCE METHODE ALTERNATIVE	Nombre d'échantillons positifs	Nombre d'échantillons négatifs	TOTAL
Nombre d'échantillons positifs	127	2	129
Nombre d'échantillons négatifs	2	131	133
TOTAL	129	133	262

Limite de détection des deux méthodes

Aucune discordance n'a été observée entre la méthode de référence et la méthode alternative et ceci quelles que soient la matrice et la souche utilisées. Les taux les plus faibles testés (de 2 à 8 cellules/25 grammes de produit) ont été détectés. Tous les résultats positifs ont été confirmés à partir de chacun des 2 milieux sélectifs d'isolement.

Sélectivité

Les résultats obtenus au cours des validations AOAC ont été repris par le laboratoire expert. Des essais complémentaires avec les sérovars Typhi, Paratyphi A et Paratyphi B ont été réalisés dans le cadre de cette étude.

Praticabilité

La praticabilité est étudiée en suivant les 13 critères décrits dans les exigences relatives aux études préliminaire et collaborative de l'AFNOR.

Le test Ultima Tecra *Salmonella* permet l'obtention de résultats dans des délais plus courts que ceux obtenus par la méthode de référence.

2.2 Etude collaborative

L'étude collaborative a été réalisée par le laboratoire expert et 11 laboratoires collaborateurs selon le référentiel existant.

La matrice « lait pasteurisé » a été inoculée avec une souche de *Salmonella* Enteritidis.

10 laboratoires ont analysé 80 échantillons et le taux de concordance est de 100%.

3 – Etude bibliographique

3.1 Autres validations

Le test 3M Tecra Ultima *Salmonella* a obtenu une nouvelle validation AOAC (révision) sous le numéro 998.09 en 2003.

3.2 Publications

Une publication est apparue depuis la dernière validation AFNOR :

Briggs, J., Dailianis, A., Hughues, D., J-Y, Garthwaite, I., 2004. Validation study to demonstrate the equivalence of a minor modification (Tecra Ultima protocol) to AOAC method 998.09 (Tecra *Salmonella* Visual immunoassay) with the cultural reference method. **Journal of AOAC International**, Vol.87,N°2, pp 1-6.

Cette étude a été proposée pour montrer que l'ajout d'un additif avant l'étape du traitement thermique n'avait pas d'effet sur le résultat final. Trois types d'aliments ont été analysés avec trois taux de contamination dont le niveau négatif. 20 échantillons (avec les différents niveaux de contamination) par type de produit ont été analysés par la méthode de référence et les deux variantes de la méthode Tecra Ultima *Salmonella*.

3.3 Bilan des réclamations utilisateurs

Aucune réclamation n'a été enregistrée.

4– Etude préliminaire (étude de reconduction) et essais complémentaires

L'ensemble des essais effectués avec la méthode alternative a été réalisé avec la limite inférieure de temps d'incubation. Les confirmations selon la méthode de référence ont été réalisées pour tous les résultats présumés positifs.

4.1 Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative de la méthode alternative et de la méthode de référence

L'objectif de cette étude est d'évaluer les performances des deux méthodes sur des échantillons contaminés et non contaminés. Les analyses sont réalisées en simple avec les 2 méthodes et les échantillons répartis dans les principales catégories de produits d'alimentation humaine et animale.

Comme convenu lors de la présentation du projet, un certain nombre d'échantillons appartenant à différentes catégories ont été analysés afin de compléter les essais antérieurs.

Il s'agit de :

- 10 ovoproduits
- 10 produits de la mer et végétaux
- 15 produits laitiers
- 40 échantillons d'alimentation animale

4.1.1 Nombre et nature des échantillons

313 échantillons ont été analysés, les catégories et les types de matrices sont répertoriés dans le tableau suivant.

Catégories	Types	Nombre de positifs *		Nombre de négatifs		Total
		2003	2007	2003	2007	
Produits carnés	Viandes crues	7	1	12	-	20
	Volaille	9	2	7	-	18
	Charcuterie	10	3	11	1	25
	Total	32		31		63
Produits de la mer et végétaux	Poissons crus	8	3	7	1	19
	Autres produits de la mer	13	4	21	1	39
	Végétaux	-	4	-	-	-
	Total	32		30		62
Produits laitiers	Fromages au lait cru et lait cru	7	10	8	1	26
	Fromages pasteurisés	7	4	19	-	30
	Laits et poudres de lait	-	3	3	1	7
	Total	31		32		63
Ovoproduits	Produits crus	19	4	13	4	40
	Mayonnaise	2	3	10	1	16
	Autres	2	3	2	-	7
	Total	33		30		63
Alimentation animale	Tourteaux et farines	-	10	-	7	17
	Granulés et croquettes	7	7	6	8	28
	Terrines et pâtées	3	6	4	4	17
	Total	33		29		62

* Résultats positifs par l'une ou l'autre des deux méthodes

4.1.2 Protocole d'essai

Dans le cas de contaminations artificielles, deux types de stress ont été utilisés et les suspensions bactériennes ont été inoculées dans la suspension-mère.

Type de stress	Souche	Origine	Log N (MNS) – - log N (MS)
20 min à 50°C ^a	S. Dublin (S59)	Lait	0,75
3 j à -20°C – 15 min à 50°C ^a	S. Enteritidis (S63)	Moules	1,00
20 min à 50°C – 20j à 4°C ^a	S. Agona (I26)	Industrie laitière	0,50
25 min à 50°C ^a	S. Enteritidis (S38)	Ovoproduit	0,70
20 min à 50°C – 20j à 4°C ^a	S. Indiana (S55)	Filet de bœuf	0,50
25 min à 50°C ^a	S. Montevideo (S75)	Tartare de bœuf	1,20
15 jours à -20°C ^a	S. Bredeney(S66)	Blanc de poulet	0,50
3 jours à -20°C	S. Enteritidis (S38)	Ovoproduit	0,53
3 jours à 4°C	S. Enteritidis (S38)	Ovoproduit	0,52
24h à -20°C	S. Enteritidis (S38)	Ovoproduit	0,50
3 jours à -20°C	S. Typhimurium (S15)	Bœuf haché	0,55
3 jours à 4°C	S. Typhimurium (S15)	Bœuf haché	0,48
24h à -20°C	S. Typhimurium (S15)	Bœuf haché	0,52
3 jours à -20°C	S. Virchow (R33)	CIP 105355	0,61
3 jours à 4°C	S. Virchow (R33)	CIP 105355	0,53

a : Stress réalisés lors de l'étude de reconduction

4.1.3 Résultats

Au total, 313 échantillons ont été analysés par les 2 méthodes.

L'interprétation des résultats est réalisée à partir de 217 échantillons analysés lors de l'étude de 2003 ainsi que de 96 nouvelles données issues de cette étude de reconduction.

Le nombre d'échantillons naturellement contaminés atteint 28,6 %.

Produits carnés

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	PA= 31	PD= 1
Méthode alternative négative (A-)	ND= 0 PPND = 0	NA= 31 PPNA = 0

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive, PP : présumé positif avant confirmation.

Ovoproduits

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	PA= 31	PD= 1
Méthode alternative négative (A-)	ND= 1 PPND = 0	NA= 30 PPNA = 0

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive, PP : présumé positif avant confirmation.

Produits de la mer et végétaux

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	PA= 32	PD= 0
Méthode alternative négative (A-)	ND= 0 PPND = 0	NA= 30 PPNA = 0

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive, PP : présumé positif avant confirmation.

Produits laitiers

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	PA= 29	PD= 0
Méthode alternative négative (A-)	ND= 2 PPND = 0	NA= 32 PPNA = 0

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive, PP : présumé positif avant confirmation.

Alimentation animale

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	PA= 33	PD= 0
Méthode alternative négative (A-)	ND= 0 PPND = 0	NA= 29 PPNA = 0

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive, PP : présumé positif avant confirmation.

Tous produits

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	PA= 156	PD= 2
Méthode alternative négative (A-)	ND= 3 PPND = 0	NA= 152 PPNA = 0

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive, PP : présumé positif avant confirmation.

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

Catégorie de produit	PA	NA	ND	PD	N	Exactitude relative AC (%)	N+	Sensibilité relative SE (%)	N-	Spécificité relative SP (%)
Produits carnés	31	31	0	1	63	98	31	100	32	97
Ovoproduits	31	30	1	1	63	97	32	97	31	97
Produits de la mer et végétaux	32	30	0	0	62	100	32	100	30	100
Produits laitiers	29	32	2	0	63	97	31	94	32	100
Alimentation animale	33	29	0	0	62	100	33	100	29	100
Total	156	152	3	2	313	98	159	98	154	99

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive.

AC = (PA+NA)/N x 100%, SE = PA/N+ x 100%, SP = NA/N- x 100%, N+ = PA+ND et N- = NA+PD.

Calcul des intervalles de confiance associés au nombre d'échantillons soumis à essai

Catégorie de produit	Exactitude relative			Sensibilité relative			Spécificité relative		
	N	AC (%)	LCL (%)	N+	SE (%)	LCL (%)	N-	SP (%)	LCL (%)
Produits carnés	63	98	96	31	100	98	32	97	92
Ovoproduits	63	97	93	32	97	92	31	97	92
Produits de la mer et végétaux	62	100	98	32	100	98	30	100	98
Produits laitiers	63	97	93	31	94	88	32	100	98
Alimentation animale	62	100	98	33	100	98	29	100	98
Total	313	98	96	159	98	96	154	99	96

LCL : limite de confiance inférieure à 95% (unilatéral)

Analyse des résultats discordants

Au cours de cette étude d'extension, un résultat discordant a été obtenu.

Il s'agit d'un échantillon de laguiole au lait cru (RD 922) contaminé artificiellement avec une souche de *S. Agona* stressée. La méthode de référence a donné un résultat positif alors que la méthode alternative a donné un résultat négatif. Les isolements réalisés à partir du bouillon RVS non thermisé ont mis en évidence une seule colonie caractéristique sur le milieu Hektoen et aucune sur le milieu XLD. Les tests de confirmation confirment la présence de *Salmonella* spp. Ce résultat discordant serait dû au seuil de détection non atteint de la méthode alternative.

Selon la norme NF EN ISO 16140 et pour l'ensemble des données (étude 2003 et étude 2007), le nombre de discordants [Y=ND (3) + PD (2)] étant de 5 (<6), aucun test n'est applicable. Les 2 méthodes sont donc comparables.

4.2 Niveau de détection relatif de la méthode alternative et la méthode de référence

L'objectif est de déterminer la concentration minimale de *Salmonella* spp. détectable dans un aliment ou matrice par les deux méthodes.

4.2.1 Protocole d'essai

Cinq couples aliment - souche de *Salmonella* spp. ont été testés :

Souche (origine)	Aliment ou produit	Flore totale
S. Typhimurium (Pièce de porc)	Viande hachée	2,9.10 ³ CFU/g
S. Enteritidis (Moules)	Saumon fumé	8,0.10 ² CFU/g
S. Dublin (Lait)	Lait cru	8,0.10 ³ CFU/mL
S. Enteritidis (Ovoproduit)	Œufs entiers	9,9.10 ¹ CFU/g
S. Infantis (Farine animale)	Aliments pour chat	1,8.10 ³ CFU/g

Quatre à six niveaux de contamination ont été testés dont le contrôle négatif.

Six réplicats ont été réalisés pour chaque niveau. Les contaminations ont été réalisées directement dans les bouillons de pré-enrichissement communs aux 2 méthodes, avant incubation.

Des suspensions d'environ 10 cellules par mL (suspension initiale) ont été préparées. A partir de la suspension initiale, des volumes de 0,3 mL et 0,1 mL sont prélevés pour contaminer 25 g ou mL de matrice pour les deux premiers niveaux. En parallèle, la suspension initiale est diluée au 1/2 et au 1/4. Un volume de 0,1 mL de ces 2 suspensions est prélevé pour contaminer 25 g ou mL de matrice. Pour l'ensemble des niveaux de contamination, l'homogénéité des inoculés est vérifiée par 30 dénombrements en gélose TSA et le calcul de l'intervalle de confiance selon la loi de Poisson est calculé.

Des essais complémentaires ont été réalisés pour la catégorie ovoproduits car il manquait un niveau.

4.2.2 Résultats

Les limites de détection pour chacune des méthodes et pour chaque catégorie de produits sont résumées dans le tableau suivant. Les résultats des essais complémentaires ont été intégrés.

Souche (origine)	Matrice	Niveau de détection relatif selon le test de Spearman-Kræber	
		Méthode de référence (*)	Méthode alternative
S. Typhimurium (Pièce de porc)	Viande hachée	0,4 ^a [0,2 ; 0,8]	0,4 ^a [0,2 ; 0,8]
S. Enteritidis (Moules)	Saumon fumé	0,7 ^a [0,5 ; 1,0]	0,7 ^a [0,5 ; 1,0]
S. Dublin (Lait)	Lait cru	2,4 ^a [1,1 ; 5,1]	4,9 ^a [2,2 ; 10,9]
S. Enteritidis (Ovoproduit)	Œufs entiers	0,9 ^a [0,4 ; 1,7]	0,9 ^a [0,4 ; 1,7]
S. Infantis (Farine animale)	Aliments pour chat	0,9 ^a [0,5 ; 1,4]	0,9 ^a [0,5 ; 1,4]

a : cellules dans 25 g (mL)

4.2.3 Conclusion

La limite de détection relative de la méthode alternative varie de 0,2 à 10,9 CFU / 25 g (mL) de matrice et celui de la méthode de référence varie de 0,2 à 5,1 CFU / 25 g (mL) de matrice.

4.3 Sélectivité

L'objectif de cette étape est de s'assurer que toutes les souches de *Salmonella* spp sont détectées par le test 3M Tecra Ultima *Salmonella* (inclusivité) et qu'il n'existe pas de réaction croisée avec les souches non *Salmonella* spp. (exclusivité).

4.3.1 Protocole d'essai

Les 50 souches cibles testées ont subi 2 repiquages successifs avant leur utilisation. Le dernier repiquage est réalisé dans le bouillon eau peptonée tamponnée. Le niveau d'inoculation est de 100 ± 50 CFU par 100 mL et le protocole complet de la méthode est ensuite appliqué.

Pour les souches non cibles, les souches testées ont subi 2 repiquages successifs avant leur utilisation. Le dernier repiquage est réalisé dans le bouillon non sélectif TSB. Le niveau d'inoculation est d'environ 10^6 CFU/mL.

4.3.2 Résultats

L'ensemble des souches de *Salmonella* spp. testées a été détecté par la méthode 3M TECRA Ultima *Salmonella*.

Huit souches non cibles ont donné un résultat douteux au test lorsqu'elles ont été testées après culture en bouillon non sélectif.

Il s'agit d'une souche de *Proteus mirabilis* (CIP 103181), une souche d'*Enterobacter sakazakii* (isolée à partir d'une poudre de lait), une souche de *Citrobacter koserii* (CIP 7211), 3 souches de *Citrobacter freundii* (une souche isolée à partir de lait, CIP 5362 et ATCC 8090), une souche d'*Enterobacter aerogenes* (CIP 60.86T) et une souche d'*Hafnia alvei* (CNRZ 73). Les confirmations réalisées selon la méthode de référence donnent un résultat négatif. Cependant, lorsque le protocole complet de la méthode alternative est appliqué, les résultats du test sont négatifs pour ces différentes souches.

4.3.3 Conclusion

Le test 3M TECRA Ultima *Salmonella* est spécifique des *Salmonella* spp.

4.4 Conservation du bouillon thermisé

Afin de vérifier la conservation des bouillons thermisés, le test 3M Tecra Ultima *Salmonella* a été effectué après thermisation du bouillon et après conservation de celui-ci 48 heures à (4 ± 2) °C. Les essais ont été réalisés lors du complément d'étude du niveau de détection pour les ovoproduits. Trente-six échantillons ont été analysés (20 échantillons négatifs et 16 échantillons positifs). Les résultats obtenus avant et après conservation du bouillon sont identiques.

5 – Etude collaborative

L'étude collaborative a été réalisée conformément au référentiel NF EN ISO 16140.

L'objectif principal de cette étude est de déterminer la variabilité des résultats obtenus dans différents laboratoires analysant des échantillons identiques et de comparer ces résultats dans le cadre de l'étude comparative des méthodes.

5.1 Mise en oeuvre de l'étude collaborative

5.1.1 Laboratoires collaborateurs

L'étude collaborative a été réalisée par le laboratoire expert et treize laboratoires collaborateurs.

5.1.2 Vérification de l'absence de *Salmonella* spp dans la matrice utilisée

L'absence de *Salmonella* spp a été vérifiée sur le lot de lait pasteurisé utilisé avant la contamination artificielle.

5.1.3 Stabilité de la souche dans la matrice lait pasteurisé

La stabilité de la souche, dans la matrice lait pasteurisé, a été évaluée sur 3 jours à (4 ± 2)°C.

La souche utilisée est *Salmonella* Enteritidis (souche sauvage isolée à partir d'ovoproduit). Deux types d'analyse ont été réalisés.

(1) – Inoculation de 10 cellules dans 25 mL de lait pasteurisé. Les échantillons ont été analysés à J0, J+1, J+2 et J+3 par la méthode de référence et par la méthode alternative.

(2) - Inoculation d'environ $2,5 \cdot 10^3$ cellules dans 25 mL de lait pasteurisé. Les échantillons ont été analysés à J0, J+1, J+2, J+3 par dénombrement sur milieu XLD.

Les résultats sont synthétisés dans le tableau 1.

Jour	Méthode alternative (1)	Méthode de référence (1)(*)	Dénombrement sur XLD (2)
J0	Présence dans 25 mL	Présence dans 25 mL	$1,1 \cdot 10^2$ CFU/mL
J+1	Présence dans 25 mL	Présence dans 25 mL	$1,2 \cdot 10^2$ CFU/mL
J+2	Présence dans 25 mL	Présence dans 25 mL	$1,3 \cdot 10^2$ CFU/mL
J+3	Présence dans 25 mL	Présence dans 25 mL	$1,1 \cdot 10^2$ CFU/mL

Tableau 1: Résultats de l'étude de stabilité effectuée sur la souche *S. Enteritidis* dans la matrice lait pasteurisé.

L'ensemble des résultats montre que la souche de *Salmonella* Enteritidis utilisée est stable pendant 3 jours à $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ dans la matrice lait pasteurisé.

5.1.4 Préparation et inoculation des échantillons

La matrice est inoculée avec la souche de *S. Enteritidis* selon le protocole des petits nombres.

Trois taux ont été testés :
 0 cellule dans 25 mL (L0),
 3 cellules dans 25 mL (L1),
 30 cellules dans 25 mL (L2)

La matrice a été répartie à raison de 25 mL dans des flacons stériles à capuchon étanche. Chaque flacon a été inoculé individuellement et homogénéisé. Huit échantillons par taux et par laboratoire ont été préparés. Chaque laboratoire a reçu 24 échantillons à tester et un échantillon pour quantifier la flore endogène de la matrice.

Matrice alimentaire	Flore totale (CFU/ mL)	Taux cibles (cellules/25 mL)	Taux réels (cellules/25 mL)	Intervalle de confiance
Lait pasteurisé	10	0	0	-
		3	4,5 ^a	[1,9] ^b
		30	35,8 ^a	[24,47] ^c

a : moyenne de 30 dénombrements, b : selon la loi de Poisson, c : selon la loi normale

Tableau 2: Résultats de dénombrements des inocula de *Salmonella* Enteritidis et de la flore totale dans le lait pasteurisé

5.1.5 Etiquetage des échantillons

L'étiquetage des flacons a été réalisé de la façon suivante :

- un code permettant d'identifier le laboratoire : A à N,
- un code permettant d'identifier chaque échantillon, connu uniquement du laboratoire expert,
- un code permettant d'identifier la méthode pour la mise en analyse.

Les échantillons et les témoins température (échantillon d'eau contenant un thermobouton) ont été stockés à 4°C avant expédition.

Taux (cellules / 25 mL)	Codes échantillon
0	4/5/9/10/12/14/18/24
3	3/6/7/11/13/15/19/21
30	1/2/8/16/17/20/22/23

Tableau 3 : Codes échantillon attribués à chaque niveau de contamination

5.1.5 Expédition des échantillons

Les échantillons ont été expédiés dans un kit froid le 11 juin 2007. Le transport a été confié à CHRONOPOST PREMIUM pour les envois en France et Chronopost International pour l'envoi en Suisse.

5.1.6 Réception et analyse des échantillons par les laboratoires collaborateurs

Les colis sont arrivés en moins de 24 heures chez les laboratoires collaborateurs à l'exception du colis à destination de la Suisse.

La température du pot témoin a été prise dès réception du colis et le thermobouton expédié au laboratoire expert pour la lecture des données. Les échantillons ont été analysés dans la journée (12 juin 2007). Le laboratoire expert a analysé, en parallèle, une série d'échantillons dans les mêmes conditions avec la méthode alternative et la méthode de référence.

5.2 Résultats

5.2.1 Température et état des échantillons à réception

Laboratoire	Température (°C)	Etat des échantillons
A	7,4	Bon
B	8,2	Bon
C	4,5	Bon
D	5,3	Bon
E	5,3	Bon
F	5,1	Bon
G	8,2	Bon
H	7,5	Bon
I	4,0	Bon
J	/	/
K	4,6	Bon
L	5,1	Bon
M	6,7	Bon

Tableau 4 : Température et état des échantillons à réception chez les laboratoires participants

L'analyse des profils thermiques des différents thermoboutons montre, pour l'ensemble des laboratoires, une température moyenne de transport des échantillons comprise entre 4,0°C et 5,3°C.

Laboratoire	Température (°C)	
	Moyenne	Ecart-type
A	4,3	0,9
B	-	-
C	4,6	1,2
D	4,9	1,6
E	4,6	0,9
F	4,8	2,0
G	5,1	0,9
H	4,0	0,8
I	4,1	1,4
J	5,3	1,6
K	-	-
L	5,1	1,3
M	4,3	0,7

Tableau 5 : Données des thermoboutons au cours de l'expédition des échantillons

Les profils thermiques des laboratoires B et K n'ont pas pu être établis. Dans le premier cas, le thermobouton a bien été réceptionné mais il a dû être endommagé car les données n'ont pas pu être récupérées. Dans le second cas, le thermobouton n'a pas été réceptionné. Les données de ces 2 laboratoires ont été intégrées dans l'analyse finale des résultats car la température du flacon témoin à réception est inférieure à 8,4°C dans les 2 cas.

Le laboratoire J a réceptionné les échantillons 2 jours après envoi. Même si la valeur de la température n'a jamais excédé 8,4°C, les données n'ont pas été intégrées car l'analyse des échantillons n'a pas été réalisée le même jour que l'ensemble des laboratoires participants.

5.2.2 Dénombrements de la flore totale

Pour l'ensemble des laboratoires, les dénombrements de la flore totale aérobie 30°C varient entre <1 et 2,3.10⁶ CFU/mL.

5.2.3 Résultats du laboratoire expert

Les résultats obtenus par le laboratoire expert sont résumés dans le tableau 6.

Niveau de contamination	Méthode alternative	Méthode de référence (*)
L0	0/8	0/8
L1	8/8	8/8
L2	8/8	8/8

Tableau 6 : Résultats positifs obtenus par le laboratoire expert avec les deux méthodes

Les résultats obtenus sont conformes à ceux attendus.

5.2.4 Résultats des laboratoires collaborateurs

L'ensemble des résultats est résumé dans le tableau 7.

Les données de 2 laboratoires H et J ont été exclues de l'analyse finale des résultats.

- le laboratoire H a fourni des résultats incohérents à plusieurs niveaux
 - Des résultats positifs ont été obtenus à partir d'échantillons non contaminés.
 - Pour le niveau L1, la présence de *Salmonella* n'a été mise en évidence qu'à partir du bouillon RVS et uniquement sur le milieu XLD.
 - Cinq échantillons ont donné un résultat positif non confirmé par la méthode alternative.
 - Des discordances entre les 2 méthodes ont été mises en évidence.
- le laboratoire J n'a pas reçu les échantillons dans les délais. Il a cependant réalisé les analyses. Les résultats bruts sont donnés en annexe à titre indicatif.

Laboratoire	Niveau de contamination		
	L0	L1	L2
A	0/8	8/8	8/8
B	0/8	8/8	8/8
C	2/8	7/8	8/8
D	0/8	8/8	8/8
E	0/8	8/8	8/8
F	0/8	8/8	8/8
G	1/8	8/8	8/8
H	-	-	-
I	0/8	8/8	8/8
J	-	-	-
K	0/8	8/8	8/8
L	0/8	8/8	8/8
M	0/8	8/8	8/8
Total	3/88 ^a	87/88 ^b	88/88 ^c

a FP : faux positifs obtenus avec la méthode alternative

b TP_{1a} : vrais positifs obtenus au niveau L1 avec la méthode alternative

c TP_{2a} : vrais positifs obtenus au niveau L2 avec la méthode alternative

Tableau 7 : Résultats positifs obtenus par l'ensemble des laboratoires collaborateurs pour la méthode alternative

Laboratoire	Niveau de contamination		
	L0	L1	L2
A	0/8	8/8	8/8
B	0/8	8/8	8/8
C	2/8	7/8	8/8
D	0/8	8/8	8/8
E	0/8	8/8	8/8
F	0/8	8/8	8/8
G	1/8	8/8	8/8
H	-	-	-
I	0/8	8/8	8/8
J	-	-	-
K	0/8	8/8	8/8
L	0/8	8/8	8/8
M	0/8	8/8	8/8
Total	3/88 ^a	87/88 ^b	88/88 ^c

a FP : faux positifs obtenus avec la méthode de référence

b TP_{1r} : vrais positifs obtenus au niveau L1 avec la méthode de référence

c TP_{2r} : vrais positifs obtenus au niveau L2 avec la méthode de référence

Tableau 8 : Résultats obtenus par l'ensemble des laboratoires collaborateurs pour la méthode de référence

1-Calcul des pourcentages de spécificité (SP) et de sensibilité (SE) pour la méthode alternative et la méthode de référence

	Méthode alternative	Méthode de référence
SP (niveau L0)	97%	97%
SE (niveau L1)	99%	99%
SE (niveau L2)	100%	100%
SE (niveau L1+L2)	99%	99%

$$SP = [1 - (FP/N_-)] \times 100\%$$

N₋ : nombre total des essais L0

FP : nombre de faux positifs

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

N₊ : nombre total des essais L1 ou L2

TP : nombre de vrais positifs

2-Calcul de l'exactitude relative pour les différents niveaux de contamination

Méthode alternative	Méthode de référence		Total
	+	-	
+	PA = 3	PD = 0	3
-	ND = 0 PPND = 0	NA = 85 PPNA = 0	85
Total	3	85	88

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive, PP : présumé positif avant confirmation.

Tableau 9 : Couples de résultats de la méthode alternative et de la méthode de référence pour le niveau de contamination L0

Méthode alternative	Méthode de référence		Total
	+	-	
+	PA = 87	PD = 0	87
-	ND = 0 PPND = 0	NA = 1 PPNA = 0	1
Total	87	1	88

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive, PP : présumé positif avant confirmation.

Tableau 10 : Couples de résultats de la méthode alternative et de la méthode de référence pour le niveau de contamination L1

Méthode alternative	Méthode de référence		Total
	+	-	
+	PA = 88	PD = 0	88
-	ND = 0 PPND = 0	NA = 0 PPNA = 0	0
Total	88	0	88

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive, PP : présumé positif avant confirmation.

Tableau 11 : Couples de résultats de la méthode alternative et de la méthode de référence pour le niveau de contamination L2

Méthode alternative	Méthode de référence		Total
	+	-	
+	PA = 178	PD = 0	178
-	ND = 0 PPND = 0	NA = 86 PPNA = 0	86
Total	178	86	264

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive, PP : présumé positif avant confirmation.

Tableau 12 : Couples de résultats de la méthode alternative et de la méthode de référence pour la totalité des résultats

3-Calcul de l'exactitude relative, de la sensibilité relative et de la spécificité relative

Catégorie de produit	PA	NA	ND	PD	N	Exactitude relative AC (%)	N+	Sensibilité relative SE (%)	N-	Spécificité relative SP (%)
Niveau L0	3	85	0	0	88	100	3	-	85	100
Niveau L1	87	1	0	0	88	100	87	100	1	-
Niveau L2	88	0	0	0	88	100	88	100	0	-
Total	178	86	0	0	264	100	178	100	86	100

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive.

AC = (PA+NA)/N x 100%, SE = PA/N+ x 100%, SP = NA/N- x 100%, N+ = PA+ND et N- = NA+PD.

4-Calcul des intervalles de confiance

	Exactitude relative			Sensibilité relative			Spécificité relative		
	N	AC(%)	LCL(%)	N+	SE(%)	LCL(%)	N-	SP(%)	LCL(%)
Niveau L0	88	100	98	3	-	-	85	100	98
Niveau L1	88	100	98	87	100	98	1	-	-
Niveau L2	88	100	98	88	100	98	0	-	-
Total	264	100	98	178	100	98	86	100	98

LCL : limite de confiance inférieure à 95% (unilatéral)

5- Analyse des résultats discordants

Aucun résultat discordant n'a été obtenu entre les 2 méthodes.

Le laboratoire C a obtenu un résultat positif sur 2 échantillons non dopés. Il semble qu'une contamination accidentelle se soit produite puisque les tests sérologiques indiquent que les souches isolées présentent les mêmes caractéristiques que celle utilisée pour le dopage des échantillons. D'autre part, ce laboratoire a également transmis un résultat négatif sur un échantillon correspondant au niveau L1 de contamination. Il est probable qu'aucune cellule de *Salmonella* n'était présente dans la prise d'essai.

Le laboratoire G a obtenu un résultat positif sur un échantillon initialement non contaminé. Ce laboratoire a signalé un incident avec le sachet filtre utilisé. Lors de l'incubation du bouillon de pré-enrichissement, une contamination croisée a dû se produire par le biais du liquide selon le phénomène de capillarité entre deux sachets. La contre analyse de cet échantillon a donné un résultat positif confirmé par les 2 méthodes. Les tests de confirmations montrent qu'il s'agit d'une souche appartenant au même séro groupe que la souche utilisée pour les contaminations artificielles.

6- Interprétation

6-1 Degré d'accord

C'est le pourcentage de chance de trouver le même résultat pour deux prises d'essai identiques (deux échantillons identiques) analysés dans le même laboratoire dans les conditions de répétabilité.

Le degré d'accord est la moyenne des probabilités que deux réplicats donnent le même résultat pour chaque laboratoire.

Niveau	Méthode alternative	Méthode de référence
L0	95%	95%
L1	98%	98%
L2	100%	100%

Tableau 13 : Degré d'accord par niveau et par méthode

6-2 Concordance

C'est le pourcentage de chance de trouver le même résultat pour deux échantillons identiques analysés dans deux laboratoires différents (conditions de reproductibilité).

La concordance est le pourcentage de toutes les paires donnant les mêmes résultats sur toutes les paires possible de résultats.

Niveau	Méthode alternative	Méthode de référence
L0	93%	93%
L1	98%	98%
L2	100%	100%

Tableau 14 : Concordance par niveau et par méthode

6-3 Odds ratio

Le calcul de *odds ratio* (COR) est défini comme suit

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

Niveau de contamination	Méthode alternative			Méthode de référence		
	Degré d'accord	Concordance	COR	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	95%	93%	1.43	95%	93%	1.43
L1	98%	98%	1	98%	98%	1
L2	100%	100%	1	100%	100%	1

Tableau 15 : Calcul de *odds ratio* pour l'ensemble des niveaux de contamination pour les 2 méthodes

Lorsque $COR=1$, le degré d'accord et la concordance sont égaux. Deux échantillons identiques ont autant de chance de donner le même résultat s'ils sont analysés par le même laboratoire que s'ils sont analysés par des laboratoires différents.

Lorsque $COR>1$, la concordance est plus petite que le degré d'accord. Deux échantillons identiques ont plus de chance de donner le même résultat s'ils sont analysés par le même laboratoire que s'ils sont analysés par des laboratoires différents.

6-4 Comparaison des valeurs d'exactitude relative (AC), de spécificité (SP) et de sensibilité (SE)

Le tableau 16 synthétise les valeurs obtenues pour ces paramètres pour l'étude préliminaire et pour l'étude collaborative.

	Etude préliminaire	Etude collaborative
Exactitude relative (AC)	98 %	100 %
Spécificité (SP)	99 %	100 %
Sensibilité (SE)	98 %	100 %

Tableau 16: Comparaison des valeurs de AC, SP et SE entre les études préliminaire et collaborative

6 - Conclusion générale

Les performances du test 3M Tecra Ultima *Salmonella* sont comparables à celles de la méthode de référence NF EN ISO 6579 (2002). Cette étude a porté sur 313 échantillons de produits d'alimentation humaine et animale.

L'exactitude obtenue est de 98%, la sensibilité relative de 98% et la spécificité relative est de 99%. Cinq résultats discordants ont été obtenus : 2 résultats positifs supplémentaires et 3 résultats faux négatifs.

Le niveau de détection relatif de la méthode alternative et de la méthode de référence a été évalué pour l'ensemble des catégories. Il varie de 0,2 à 10,9 CFU / 25 g (mL) de matrice et de 0,2 à 5,1 CFU / 25 g (mL) de matrice respectivement pour la méthode alternative et pour la méthode de référence.

La spécificité du 3M Tecra Ultima *Salmonella* est satisfaisante.

Onze laboratoires ont analysé 264 échantillons.

Les valeurs de l'exactitude relative, de la sensibilité relative et de la spécificité relative obtenues suite à l'étude collaborative sont comparables à celles obtenues lors de l'étude préliminaire. La variabilité de la méthode alternative, mise en évidence par les calculs du degré d'accord, de la concordance et des *odds ratio*, est similaire à celle de la méthode de référence.