



**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 : AES-10/04-05/04

Date de validation : 07.05.2004

Extension : 02.07.2007

Reconduction : 27.03.2008

Fin de validité : 07.05.2012

La Société AES CHEMUNEX
(siège social) rue Maryse Bastié
Ker Lann / CS 17219
35172 BRUZ CEDEX

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

SIMPLE METHOD FOR SALMONELLA (SMS™)

Références du protocole : fiche technique SMS™ : 520069 : 27/03/08 - Q

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine et animale et échantillons d'environnement (hors environnement d'élevage)

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

La méthode est destinée à la détection des *Salmonelle* mobiles et n'est pas adaptée à la détection des *Salmonella* immobiles (souches immobiles ou ayant perdu leur mobilité)

METHODE DE REFERENCE

NF EN ISO 6579, 2002 : Directives générales concernant les méthodes de recherche des *Salmonella*

**Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN**

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

Le principe du SMS repose sur la mobilité des salmonelles et leur aptitude à décarboxyler la L-lysine. Après le pré-enrichissement, l'EPT incubée est déposée sur le bord de la boîte contenant le milieu gélosé SMS. Après incubation à 41°C +/- 1°C pendant 24h +/- 1h, les salmonelles produisent des zones de migration supérieures à 2 cm, associées à un virage au rouge de la gélose.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue du test SMS doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

1. par repiquage sur milieu SMS sur une gélose sélective pour salmonelles, et mise en œuvre des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN, l'ISO ou l'AFNOR (en incluant l'étape de purification).
2. par repiquage ou isolement à partir d'une boîte de SMS présomptivement positive, et mise en œuvre du test SMS Confirmation (2 options) selon les instructions décrites dans la notice de ce test
3. Par toute autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION, de principe différent de la méthode SMS, selon les instructions décrites dans la notice.

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.

NOTE : Historique de la Validation

La première validation a été prononcée en mai 2004, selon le protocole de la norme EN ISO 16140.

En février 2007, une étude d'extension a été menée pour ajouter une option de confirmation supplémentaire (Cf. 2^{ème} option présentée ci-dessus, avec l'utilisation du test SMS Confirmation).

Des essais ont été réalisés en souches pures sur :

- 150 souches de *Salmonella spp* de sérotypes et d'origines variées ont été testées
- 105 souches non cibles (le choix étant orienté par la proximité génétique de *Salmonella spp*) ont été testées.

Les résultats obtenus étaient conformes à ceux attendus.

En mars 2007, la validation a été reconduite sans réalisation d'essais complémentaires, puisque ni la méthode SMS, ni la méthode prise en référence, ni le protocole de validation n'ont été modifiés.

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 2004 sur 378 échantillons de produits dont 47 naturellement contaminés, 138 artificiellement contaminés et 193 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : produits carnés, produits de la mer, ovoproduits, produits laitiers, échantillons d'environnement, alimentation animale

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 = 181 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 3 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 1 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 193 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

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

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

- **Exactitude relative** : 99%
- **Spécificité relative** : 99%

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

- **Sensibilité relative** : 98%

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

Pour la méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 98,4 \%$$

Pour la méthode alternative :

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

Conclusion

Les performances de la méthode SMS apparaissent équivalentes à celles de la méthode de référence.

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2004, sur des combinaisons suivantes produits alimentaires/souches, pour les catégories suivantes : produits carnés, produits laitiers, ovo-produits, produits de la mer, échantillons 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
Viande hachée de bœuf	<i>S.typhimurium</i>	0.46 [0.315 , 0.673]	0.46 [0.315 , 0.673]
Lait cru	<i>S.dublin</i>	0.50 [0.362 , 0.703]	0.50 [0.362 , 0.703]
Oeuf entier	<i>S.enteritidis</i>	0.36 [0.261 , 0.506]	0.36 [0.261 , 0.506]
Filet de lieu noir	<i>S.virchow</i>	0.25 [0.151 , 0.428]	0.25 [0.151 , 0.428]
Eau de process	<i>S.typhimurium</i>	0.46 [0.315 , 0.673]	0.46 [0.315 , 0.673]

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

Conclusion

La limite de détection de la méthode alternative se situe entre 0.151 et 0.703 UFC/25 g.

Les niveaux de détection relatifs obtenus pour la méthode alternative sont identiques à ceux obtenus pour la méthode de référence, quel que soit le couple matrice/souche utilisé.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 57 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 64 testées. Les sérovars non détectés sont *gallinarum* (immobile) et *paratyphi* A. Une souche de *S.infantis* sur 5 testées et une souche de *S.paratyphi* C n'ont pas été détectées.
- L'étude de 30 souches non *Salmonella* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 5 à 6 jours avec la méthode alternative (en incluant la confirmation par les tests classiques de la norme de référence) contre 5 à 7 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours avec la méthode alternative contre 5 à 7 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 3 à 5 jours

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2004 avec 14 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de *Salmonella enteritidis* aux 3 niveaux suivants :

- niveau 0
- niveau légèrement supérieur au niveau de détection relatif
- niveau 10 fois supérieur au niveau précédent

Les laboratoires ont testé, par les **deux méthodes**, **8 réplicats** pour **chaque niveau** de contamination, soient 672 analyses au total pour l'ensemble des laboratoires collaborateurs.

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	112	112	104	104	104	0	0
1	112	112	104	5	5	99	99
2	112	112	104	0	0	104	104

Les résultats d'un laboratoire n'ont pas été exploités car, lors d'un premier envoi, deux résultats discordants ont été observés (échantillons obtenus positifs avec confirmation par la méthode de référence et négatifs par la méthode alternative). Le laboratoire évoque une erreur de prélèvement dans les sacs de la suspension-mère. La contre analyse, demandée par le laboratoire expert à partir de l'eau peptonée tamponnée conservée à 4°C, a donné des résultats conformes (les 2 échantillons ont donné un résultat négatif pour les 2 méthodes). Cependant cette contre analyse a été réalisée une semaine après la date de la réalisation des tests par les laboratoires participants, raison pour laquelle ce laboratoire a été exclu de l'interprétation.

Calculs

- L'**exactitude relative** est de 100 %
- La **spécificité** est de 100%
- La **sensibilité** est de 98%

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 inclue les positifs supplémentaires de la méthode alternative), comme suit :

Pour la méthode de référence :

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

Pour la méthode alternative :

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

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 réplicats 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 réplicats 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** et pour la **méthode de référence** :

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1
L1	92%	91%	1,14
L2	100%	100%	1

Conclusion

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

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

Vous trouverez le document de synthèse des études préliminaire et interlaboratoire
sur le site www.afnor-validation.org