



**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 : BRD 07/11 – 12/05

Date de validation :	09.12.2005
Date d'extension :	03.07.2009
	21.05.2010
Date de reconduction :	24.09.2009
Fin de validité :	09.12.2013

La Société
(siège social, distributeur et site de production)

BIO-RAD
3 Boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes la Coquette

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

RAPID' Salmonella

Référence du protocole : RAPID' Salmonella/Gélose (356-3961 et 356-4705) V9

DOMAINE D'APPLICATION

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

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Le test de confirmation ONPG exclut la confirmation des *Salmonella* lactose+.

Le test Latex *Salmonella* exclut la confirmation des *Salmonella* autres que celles du groupe B à E et G.

METHODE DE REFERENCE

NF EN ISO 6579 (2002) : Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp.

**Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN**

PRINCIPE DE LA METHODE

RAPID'*Salmonella* est un milieu de culture gélosé chromogénique, dont le principe repose sur la mise en évidence de deux activités enzymatiques. Les *Salmonella spp* se présentent sous la forme de colonies caractéristiques magenta (détection de l'activité C8-estérase). Une contre sélection est utilisée pour faire apparaître les autres bactéries avec une coloration différente. RAPID'*Salmonella* permet la détection des salmonelles mobiles et immobiles, ainsi que les *Salmonella* lactose positive, incluant *Salmonella Typhi* et *Paratyphi*.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode RAPID'*Salmonella* doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

- A partir des colonies isolées sur milieu chromogénique, selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification),
- Par l'utilisation de sondes nucléiques tel que prévu dans la norme EN ISO 7218 à partir des colonies isolées (avec ou sans l'étape de purification)
- A partir d'une à trois colonies isolées, par évaluation de l'activité oxydase (test oxydase) puis réalisation du test antisérum omnivalent Omni-O. Si la réaction est positive au test Omni-O, réaliser un test biochimique ONPG. Les *Salmonella* sont négatives au test oxydase, positives au test Omni-O et négatives au test ONPG.
- Par l'utilisation d'un test SALMONELLA LATEX sur des colonies isolées. Les salmonelles des groupes B à E et G sont positives au test latex.
- Par l'utilisation de toute autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION de principe différent de la méthode RAPID'*Salmonella*. Le protocole validé de la seconde méthode devra être respecté dans son ensemble, c'est à dire que les étapes antérieures à l'étape intermédiaire de laquelle le manipulateur repartira pour la confirmation doivent être communes aux deux méthodes.

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 oeuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

Note 1 : Certaines souches de *Salmonella* (dont celles appartenant au sérovar Dublin, ainsi que l'espèce *S. bongori*) peuvent présenter une pigmentation magenta faible (à nulle) du fait de leur faible activité estérasique.

Note 2 : protocoles validés dans le cadre de la marque AFNOR Validation

Trois protocoles sont certifiés AFNOR VALIDATION :

- Protocole court : enrichissement en eau peptonée tamponnée supplémentée de 18h±2h à 41,5°C±1°C, suivi d'un isolement sur gélose RAPID'*Salmonella* incubée 24h±2h à 37°C : **tous produits d'alimentation humaine et animale, et prélèvements d'environnement (hors échantillons de production primaire) (1)**
- Protocole double enrichissement, avec un enrichissement en eau peptonée tamponnée 18h ±2h à 37°C ±1°C, suivi de deux voies distinctes au niveau de l'étape de second enrichissement en bouillon sélectif RVS, selon le type de produits analysés :
 - de 8h±2h à 24h±2h à 41,5°C±1°C pour les catégories suivantes : **produits de la mer, produits végétaux, produits laitiers et ovoproduits (2)**
 - de 24h±2h à 41,5°C±1°C pour les catégories suivantes : **produits carnés et produits d'alimentation animale (3)**

Suivi d'un isolement sur gélose RAPID'*Salmonella* incubée 24h ±2h à 37°C.

Note 3 : Historique de validation

1/ En juillet 2009, de nouveaux essais ont permis d'étendre la validation au « protocole court » et à une nouvelle option de confirmation « test Latex », et de valider un changement dans l'aspect de la gélose (opacification).

L'étude d'exactitude a été complétée par :

- l'analyse de 118 échantillons répartis sur l'ensemble des catégories par le protocole long,
- par la réalisation d'une étude d'exactitude, spécificité et sensibilité avec l'analyse de 324 échantillons par le protocole court, les études d'inclusivité et exclusivité ont également été complétées.

Ces résultats sont intégrés dans la présente attestation.

2/ Dans le cadre de l'étude de reconduction de 2009, aucun essai complémentaire n'a été réalisé, la méthode RAPID'*Salmonella* n'ayant pas été modifiée depuis la dernière validation, et le protocole de validation ainsi que la méthode de référence restant inchangés.

3/ L'étude d'extension de mai 2010 a été menée pour valider l'analyse des prélèvements d'environnement (hors échantillons de production primaire) avec le « protocole court ». Les paramètres suivants ont été testés : Exactitude/Spécificité/Sensibilité relatives et Niveau de détection relatif. Les résultats étaient conformes à ceux attendus. En tenant compte de ces nouvelles données, les résultats « toutes catégories confondues » ont été recalculés pour le protocole court et sont repris dans cette attestation.

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 2005 sur 408 échantillons dont 84 naturellement contaminés, 107 artificiellement contaminés et 217 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : produits carnés, produits laitiers, produits de la mer et végétaux, ovoproduits, produits d'alimentation animale.

Tous les échantillons ont été analysés en simple par les deux méthodes. Les deux voies du protocole "double enrichissement" ont été mis en œuvre.

Protocole "double enrichissement" (avec incubation du RVS pendant 6 heures) : 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 = 78 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 6 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 11 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 102 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont 4 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, 3 négatifs après confirmation par les résultats du test Oxydase

(3) dont 23 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation, dont 14 éliminés d'emblée par les résultats du test Oxydase

Protocole "double enrichissement" (avec incubation du RVS pendant 24h ± 2h) : 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 = 166 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 13 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 12 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 217 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont 4 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, tous négatifs après confirmation par le test Oxydase

(3) dont 50 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation, dont 30 éliminés d'emblée par les résultats du test Oxydase.

Dans le cadre des études d'extension de 2009 et de 2010, de nouveaux essais ont été réalisés sur au total 409 échantillons de produits dont 66 naturellement contaminés, 137 artificiellement contaminés et 206 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, produits laitiers, produits de la mer et végétaux, ovoproduits, produits d'alimentation animale et échantillons d'environnement.

Tous les échantillons ont été analysés en simple par les deux méthodes. Le protocole "court" a été mis en œuvre.

Protocole "court" : 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 = 167 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 17 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 19 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 206 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont un échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation par test latex

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

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

	Protocole "double enrichissement"		Protocole "court"
	Incubation RVS pendant 6h	Incubation RVS 24h±2h	
Exactitude relative : AC (%)	91,4	93,9	91,2
Spécificité relative* : SP (%)	94,4	94,3	92,4
Sensibilité relative : SE (%)	87,6	93,3	89,8

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

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

Protocole "double enrichissement" avec incubation RVS pendant 6h

Méthode alternative :
(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 88,4%

Méthode de référence :
(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 93,7%

Protocole "double enrichissement" avec incubation RVS pendant 24h±2h

Méthode alternative :
(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 93,7%

Méthode de référence :
(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 93,2%

Protocole "court"

Méthode alternative :
(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 90,6%

Méthode de référence :
(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 91,6%

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

Protocole avec incubation RVS pendant 6h

$$Y = ND + PD = 17 \quad 6 < y < 22 \quad m = PD = 6 \quad M = 4 \quad m > M$$

Protocole avec incubation RVS pendant 24h±2h

$$Y = ND + PD = 25 \quad y > 22$$

Le test de Mc Nemar est appliqué : $X^2 = d^2/y \quad d = |PD-ND| = 1 \quad x^2 = 0,04 (x^2 < 3,841)$

Protocole court

$$Y = ND + PD = 36 \quad y > 22$$

Le test de Mc Nemar est appliqué : $X^2 = d^2/y \quad d = |PD-ND| = 2 \quad x^2 = 0,105 (x^2 < 3,841)$

Conclusion

Pour tous les protocoles testés, les deux méthodes ne sont pas différentes en termes statistiques.

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2005, sur les 5 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : produits carnés, produits laitiers, produits de la mer, ovoproduits, produits d'alimentation animale.

Les produits ont été analysés **6 fois**, par les **deux méthodes**, à **4 niveaux** de contamination. Les deux voies du protocole "double enrichissement" ont été mis en œuvre.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Protocole double enrichissement avec incubation RVS pendant 6h :

Matrice	Souche	Niveau de détection relatif LOD ₆₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Steak haché	<i>Salmonella</i> Infantis	0,8 [0,3 – 2,4]	0,8 [0,3 – 2,4]
Lait cru	<i>Salmonella</i> Typhimurium	1,8 [0,6 – 5,6]	1,8 [0,6 – 5,6]
Filet de poisson	<i>Salmonella</i> Saintpaul	0,4 [0,1 – 2,1]	0,4 [0,1 – 2,1]
Coule d'oeuf	<i>Salmonella</i> Enteritidis	0,8 [0,2 – 3,4]	0,5 [0,1 – 2,2]
Bouchées en gelée	<i>Salmonella</i> Agona	0,5 [0,1 – 2,5]	0,5 [0,1 – 2,5]

(3) LOD₆₀ : Cf. tableau suivant

Protocole double enrichissement avec incubation RVS pendant 24h±2h :

Matrice	Souche	Niveau de détection relatif LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Steak haché	<i>Salmonella</i> Infantis	0,7 [0,3 – 2,1]	0,8 [0,3 – 2,4]
Lait cru	<i>Salmonella</i> Typhimurium	0,6 [0,1 – 2,6]	1,8 [0,6 – 5,6]
Filet de poisson	<i>Salmonella</i> Saintpaul	0,4 [0,1 – 2,1]	0,4 [0,1 – 2,1]
Coule d'oeuf	<i>Salmonella</i> Enteritidis	0,8 [0,2 – 3,4]	0,5 [0,1 – 2,2]
Bouchées en gelée	<i>Salmonella</i> Agona	0,5 [0,1 – 2,5]	0,5 [0,1 – 2,5]

(3) LOD₅₀ : Cf. tableau suivant

Dans le cadre de l'étude d'extension de 2009, puis de celle de 2010, de nouveaux essais ont été réalisés sur au total les 6 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : produits carnés, produits laitiers, produits de la mer, ovoproduits, produits d'alimentation animale.

Les produits ont été analysés **6 fois**, par les **deux méthodes**, à **4 niveaux** de contamination. Le protocole court a été mis en œuvre.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Protocole "court" :

Matrice	Souche	Niveau de détection relatif LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Steak haché	<i>Salmonella</i> Infantis	0,4 [0,1 – 1,4]	0,3 [0,1 – 1,1]
Lait cru	<i>Salmonella</i> Derby	0,4 [0,2 – 0,9]	0,5 [0,2 – 1,3]
Filet d'églefin	<i>Salmonella</i> Saintpaul	0,4 [0,2 – 1,1]	0,6 [0,2 – 1,5]
Coule d'oeuf	<i>Salmonella</i> Enteritidis	0,4 [0,1 – 1,2]	0,3 [0,1 – 1,0]
Croquettes pour chien	<i>Salmonella</i> Agona	0,6 [0,2 – 1,6]	0,3 [0,1 – 1,1]
Eau de rinçage de salaison	<i>Salmonella</i> Typhimurium	0,5 [0,1 – 1,8]	0,6 [0,2 – 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

Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,1 et 5,6 UFC/25 g.

Le niveau de détection de la méthode alternative se situe entre :

- 0,1 et 5,6 UFC/25 g pour le protocole "double enrichissement" avec incubation RVS de 6h
- 0,1 et 3,4 UFC/25 g pour le protocole "double enrichissement" avec incubation RVS de 24h
- 0,1 et 1,8 UFC/25 g pour le protocole "court"

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

Etude de 2005 :

- 51 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 52 testées. La souche non reconnue est une souche *Paratyphi A*. Deux autres souches de *Salmonella Paratyphi A* ont été testées et ont montré des colonies magenta sur gélose RAPID'*Salmonella*. Toutes les souches cibles montrent un profil Omni-O positif / ONPG négatif, sauf *Salmonella arizonae* (phénotype lactose positif) qui présente un test ONPG positif.
- L'étude de 30 souches non *Salmonella* a montré l'obtention de colonies caractéristiques sur gélose RAPID'*Salmonella* pour une seule souche d'*Enterobacter sakazakii*. Cette dernière présente, par contre, un test Omni-O négatif, non caractéristique des salmonelles.

Certaines souches d'*Escherichia hermanii* isolées au cours de l'étude montrent des colonies magenta. De ce fait, douze souches de cette espèce ont été testées. Huit montrent une réaction positive au test Omni-O, mais présentent une réaction ONPG positive, non caractéristique des salmonelles.

Etude de 2009 (protocole court) :

- 47 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 51 testées. Trois souches de *Salmonella* (*Salmonella Paratyphi A* ATCC 9150, *Salmonella Paratyphi B* Ad 301 et *Salmonella Paratyphi C* ATCC 13428) ont montré des difficultés de croissance, ainsi que *Salmonella gallinarum* Ad 300. Cinq souches de *Salmonella* ont donné un test latex négatif : *Salmonella arizonae* Ad 450, *Salmonella bongori* Ad 599, *Salmonella cerro* Ad 689, *Salmonella Houtenae* Ad 596 et *Salmonella Veneziana* Adria 233.
- L'étude de 42 souches non *Salmonella*, dont 12 souches d'*Escherichia hermanii*, ont été étudiées. Onze des souches d'*Escherichia hermanii*, une souche de *Citrobacter diversus* Adria 140 et une souche de *Serratia marescens* Ad 447 ont donné des colonies magenta avec une coloration plus terne que celle observée avec *Salmonella*. Ces souches ont toutes donné un test latex négatif.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 2 jours (protocole "court"), entre 3 à 4 jours (protocole "double enrichissement" avec incubation RVS 6h) et 4 à 5 jours (protocole "double enrichissement" avec incubation RVS 24h±2h) avec la méthode alternative, contre 5 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours (protocole "double enrichissement" avec incubation RVS 6h et protocole "court") ou 3 jours (protocole "double enrichissement" avec incubation RVS 24h±2h) 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 3 à 5 jours selon le protocole de confirmation effectué.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2005 avec 15 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 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.

Les deux voies du protocole "double enrichissement" ont été mis en œuvre.

Résultats pour le protocole "double enrichissement" avec incubation RVS de 8h±2h:

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	120	120	88	88	88	0	0
1	120	120	88	0	0	88	88
2	120	120	88	0	0	88	88

*les résultats de 4 laboratoires ont été exclus pour des raisons de résultats aberrants résultant a priori d'intercontaminations et/ou de discordances dans les tests d'identification

Résultats pour le protocole "double enrichissement" avec incubation RVS de 24h±2h:

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	120	120	80	80	78	0	2**
1	120	120	80	0	0	80	80
2	120	120	80	0	0	80	80

*les résultats de 5 laboratoires ont été exclus pour des raisons de résultats aberrants résultant a priori d'intercontaminations et/ou de discordances dans les tests d'identification.

** Positifs supplémentaires confirmés par la méthode alternative.

Calculs :

	Protocole avec incubation 8h±2h	Protocole avec incubation 24h±2h
Exactitude relative	100 %	99,2 % **
Sensibilité	100 %	100 %
Spécificité*	100 %	97,7 % **

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

** Positifs supplémentaires confirmés par la méthode alternative.

Interprétation

Les résultats de l'étude interlaboratoire 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) :

	Protocole 8 h ± 2 h	Protocole 24 h ± 2 h
Méthode alternative	100 %	100 %
Méthode de référence	100 %	98,7 %

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 répliqués donnant le même résultat.

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

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

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

Niveau de contamination	Degré d'accord		Concordance		COR	
	8h±2h	24h±2h	8h±2h	24h±2h	8h±2h	24h±2h
L0	100	96,2	100	97,6	1,00	0,62
L1	100	100	100	100	1,00	1,00
L2	100	100	100	100	1,00	1,00

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100	100	1,00
L1	100	100	1,00
L2	100	100	1,00

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 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