

PRINCIPE DE LA METHODE

TRANSIA® PLATE *Salmonella* GOLD est un test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) basé sur une réaction de type sandwich en trois étapes. La procédure d'enrichissement s'effectue en deux étapes, avec un pré-enrichissement en eau peptonée tamponnée, suivi d'un enrichissement sélectif en milieu Rappaport Vassiliadis Soja. Le support solide de la réaction est une plaque de microtitration à barrettes sécables, dont les puits sont greffés avec des anticorps spécifiques du genre *Salmonella*. La lecture de la microplaque se fait avec un spectrophotomètre à une DO de 450 nm.

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

- selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification), en réalisant au préalable l'isolement sur deux géloses sélectives différentes à partir du milieu sélectif utilisé pour l'enrichissement (RVS)
- avec toute autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION de principe différent de la méthode TRANSIA® PLATE *Salmonella* GOLD, en suivant les instructions décrites dans la notice du fabricant.

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

NOTE (historique de validation)

1/ Etude de reconduction de 2005 :

En 2005, la reconduction de la méthode TRANSIA® PLATE *Salmonella* GOLD a été réalisée selon le protocole décrit dans la norme EN ISO 16140 (2003), en comparaison à la nouvelle méthode de référence EN ISO 6579 (2002) (validation initiale de 2001 réalisée selon un ancien protocole de validation, en comparaison à la norme EN 12824).

En outre, le protocole de la méthode TRANSIA® PLATE *Salmonella* GOLD a été modifié (réalisation des tests soit à partir du bouillon RVS juste après incubation et choc thermique, soit après conservation des bouillons RVS à 3°C ± 2°C jusqu'à 48h et choc thermique) et la validation a été étendue aux prélèvements d'environnement.

L'étude préliminaire et l'étude collaborative ont été complètement refaites selon le protocole EN ISO 16140. Tous les échantillons positifs (artificiellement et naturellement contaminés) ainsi que les échantillons douteux, ont été retestés après 48h de conservation du bouillon RVS à 3°C ± 2°, pour valider la possibilité de réalisation des tests après conservation des bouillons au froid jusqu'à 48h.

2/ Etude de reconduction de 2009 :

Depuis la dernière validation :

- Le protocole de validation et la méthode de référence n'ont pas changé.
- La méthode TRANSIA® PLATE *Salmonella* GOLD a été modifiée au niveau de la mise en oeuvre du test immuno-enzymatique. L'étape de préparation du mélange substrat-chromogène a été supprimée, les réactifs ayant été combinés en un seul flacon prêt à l'emploi. Le protocole a été complété d'une étape d'extraction (ajout d'un additif à l'échantillon avant choc thermique).

Des essais complémentaires ont été réalisés afin de démontrer que ces changements n'avaient pas d'incidence sur les résultats précédemment obtenus :

- 148 échantillons, dont 63 positifs et 85 non contaminés ont été testés. pour la partie exactitude relative/ spécificité relative/ sensibilité relative. Aucun échantillon discordant entre la méthode alternative et la méthode de référence n'a été obtenu.
- L'étude de sélectivité a été complétée pour la partie inclusivité (selon de nouvelles exigences spécifiques de la marque AFNOR Validation). Les résultats sont disponibles dans la présente attestation.

- Des essais internes complémentaires, examinés par le bureau technique AFNOR VALIDATION, mais non repris dans cette attestation, ont été réalisés pour comparer la sélectivité (inclusivité et exclusivité) de la méthode alternative "avec" ou "sans étape d'extraction".

L'ensemble des résultats montrent que les performances de la méthode TRANSIA® Plate *Salmonella* Gold ne sont pas modifiées.

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 429 échantillons de produits dont 69 naturellement contaminés, 118 artificiellement contaminés et 242 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

- Produits carnés
- Produits laitiers
- Produits végétaux et produits de la pêche
- Divers (ovoproduits, plats cuisinés, pâtisseries)
- Alimentation animale
- 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 = 186 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 0 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 1 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 242 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) (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 : **99,8%**
- Spécificité relative : **100%**
- Sensibilité relative : **99,5%**

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 :

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

Méthode de référence :

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

Conclusion

Les performances de la méthode TRANSIA® PLATE *Salmonella* GOLD apparaissent équivalentes à celles de la méthode de référence.

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2004, sur 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 végétaux et produits de la pêche
- Divers (ovoproduits, plats cuisinés, pâtisseries)
- Alimentation animale
- 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 volaille	<i>Salmonella</i> Hadar	0,3 [0,2 – 0,5]	0,3 [0,2 – 0,5]
Lait cru	<i>Salmonella</i> Typhimurium	0,8 [0,4 – 1,4]	0,8 [0,4 – 1,4]
Coule d'œufs	<i>Salmonella</i> Enteritidis	0,7 [0,4 - 1,3]	0,7 [0,4 - 1,3]
Filet d'églefin	<i>Salmonella</i> Virchow	0,3 [0,2 – 0,5]	0,3 [0,2 – 0,5]
Aliments pour animaux	<i>Salmonella</i> Senftenberg	0,5 [0,3 – 0,9]	0,5 [0,3 – 0,9]
Eau de process	<i>Salmonella</i> Infantis	0,7 [0,4 – 1,5]	0,7 [0,4 – 1,5]

(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 Used 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 alternative se situe entre 0,2 et 1,5 UFC/25 g. Il est identique à celui de la méthode de référence

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE (étude de 2005 et compléments en 2009)

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- En 2005, 50 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 50 testées.
Des essais complémentaires ont été réalisés en 2009 (étude de reconstitution) sur 10 souches cibles. Une des souches testée n'a pas été détectée par la méthode alternative : il s'agit de *Salmonella arizonae* IIIa 48:z4 z23.
- 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 7 jours avec la méthode alternative (en incluant la purification et les tests classiques de la méthode de référence), comme pour la méthode de référence.
- L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours avec la méthode alternative contre 3 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 7 jours.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2004 avec 11 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de *Salmonella* Typhimurium aux 3 niveaux suivants :

- niveau 0
- niveau légèrement supérieur au niveau de détection relatif (3 cellules / 25ml)
- niveau 10 fois supérieur au niveau précédent (30 cellules / 25ml)

Les laboratoires ont testé, par les **deux méthodes**, **8 réplicats** pour **chaque niveau** de contamination, soit 260 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	88	80	80	80	80	0	0
1	88	80	80	4	5	76	75
2	88	80	80	0	0	80	80

* Un laboratoire n'a pas reçu les échantillons dans le délai prévu et n'a pas réalisé les analyses.

Calculs

- L'exactitude relative est de **99,6%**
- le % de spécificité est de **100%**
- le % de sensibilité est de **96,9%**

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) :

Méthode alternative :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 99,4\%$$

Méthode de référence :

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

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 :

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

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1,00
L1	91%	87,7%	1,04
L2	100%	100%	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	93%	90,1%	1,03
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