

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode LUMIPROBE 24 *Salmonella* species est un test associant un enrichissement en milieux de culture spécifiques et une hybridation de sondes nucléiques en phase solide, permettant la détection rapide et spécifique des Salmonelles. L'ARNr de la bactérie cible, libéré par lyse, capturé par un oligonucléotide immobilisé sur un support coaté, est hybridé avec un deuxième oligonucléotide marqué. La formation des hybrides est révélée par une réaction de chemiluminescence.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode alternative doivent être confirmés à partir du bouillon sélectif sur lequel le test LUMIPROBE 24 a été réalisé selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification).

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé par les tests décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO), le laboratoire devra mettre en oeuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

NOTE : Historique de validation

1/ La reconduction de la validation de 2005 a pris en compte les modifications suivantes par rapport à la première validation en 2000 (ovoproduits) étendue en 2002 (extension à tous produits) :

- Nouvelle méthode de référence EN ISO 6579 (2002) en remplacement de la norme EN 12824
- Nouveau protocole de validation normalisé EN ISO 16140

Certains essais effectués en 2000 et 2002 ont été conservés (notamment l'intégralité de l'étude interlaboratoire réalisée selon les exigences AFNOR révision 7) et l'étude préliminaire a été complétée sur les points suivants : exactitude, sensibilité et spécificité relatives, niveau de détection relatif, inclusivité.

2/ En 2009, le droit d'usage de la méthode a été reconduit. Depuis la dernière validation, la méthode de référence n'a pas changé et la méthode alternative n'a pas été modifiée. L'étude interlaboratoire a été refaite en accord avec les exigences de l'EN ISO 16140. L'étude préliminaire a également été complétée, pour la catégorie produits laitiers, sur les paramètres exactitude, spécificité et sensibilité relatives, le niveau de détection relatif, et l'inclusivité. La présente attestation reprend l'ensemble de ces résultats.

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, puis complétés en 2008, sur au total 334 échantillons de produits dont 51 naturellement contaminés, 110 artificiellement contaminés et 173 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : produits carnés, produits de la mer et végétaux, produits laitiers, ovoproduits et 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 = 151 ⁽¹⁾ | Déviations positives A+ / R- PD = 3 ⁽¹⁾ |
| Méthode alternative négative (A-) | Déviations négatives A- / R+ ND = 7 ⁽²⁾ | Accord négatif A- / R- NA = 173 ⁽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 : **AC = 97,0 %**
- Spécificité relative : **SP = 98,3 %**

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

- Sensibilité relative : **SE = 95,6 %**

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = \mathbf{95,6 \%}$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = \mathbf{98,1 \%}$$

Analyse des discordants (selon annexe F de la norme NF EN ISO 16140) :

$$PD = 3, ND = 7; \quad Y = PD + ND = 10; \quad 6 \leq Y \leq 22; \quad m = 3, M = 1; \quad \text{donc } m > M$$

Conclusion

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 de la mer et végétaux, produits laitiers, ovoproduits et alimentation animale.

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 |
| Oeufs entiers | S. Enteritidis S38 | 0,6 [0,4 - 1,0] | 0,8 [0,5 - 1,2] |
| Viande hachée | S. Typhimurium S15 | 1,6 [1,0 - 2,4] | 1,3 [1,0 - 1,8] |
| Lait cru | S. Dublin S59 | 8,2 [5,6 - 11,9] | 1,9 [1,1 - 3,4] |
| Saumon fumé | S. Enteritidis S63 | 1,0 [0,6 - 1,7] | 1,0 [0,6 - 1,7] |
| Granulés pour rongeurs | S. spp S65 | 0,6 [0,4 - 1,1] | 1,0 [0,6 - 1,7] |

(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"

En 2008, de nouveaux essais ont été réalisés pour les matrices produits laitiers sur les combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

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 |
| Lait cru | S. Dublin | 0,8 [0,6 – 1,2] | 0,9 [0,7 – 1,3] |
| Lait cru | S. Newport | 0,6 [0,5 – 0,8] | 0,6 [0,4 – 0,8] |

(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 alternative se situe entre 0,4 et 11,9 UFC/25 g.

Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,4 et 3,4 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

Etude 2000 et 2002

- 50 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 30 souches n'appartenant pas au genre *Salmonella* a mis en évidence la présence de réactions croisées avec 2 souches de *Citrobacter diversus* (*C. diversus* 140 et *C. diversus* CIP 8294) et 1 souche d'*Enterobacter sakazakii* 95. Ces réactions croisées n'ont pas été retrouvées sur coule d'œuf ; 7 autres souches d'*E. sakazakii* testées ont donné des réponses négatives.
- Deux souches de *Citrobacter freundii* (23 et 175) et une souche d'*Enterobacter agglomerans* (II) ont donné une réaction croisée uniquement par test sur BHI, elles n'ont pas été détectées par le protocole propre à la méthode Lumiprobe (RM et Rappaport Vassiliadis).

Etude complémentaire 2005

- Les 6 souches de *Salmonella* (1 Typhi, 2 Paratyphi A, 2 Paratyphi B, 1 Paratyphi C) testées ont été détectées.

Etude complémentaire 2008

- 21 autres souches de *Salmonella* ont été détectées sur 24 testées.
Trois souches de *Salmonella* Gallinarum n'ont pas été initialement détectées. Pour une contamination initiale de 50 à 70 CFU/225 ml, le seuil de détection de la méthode LUMIPROBE 24 *Salmonella* species n'a pas été atteint pour ce sérovar, à croissance reconnue plus lente que les autres sérovares de *Salmonella*.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- Délai d'obtention des résultats :
 - L'obtention des résultats positifs se fait en 4 à 6 jours avec la méthode alternative contre 5 à 7 jours avec la méthode de référence.

- L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 1 jour 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.
- **Formation du personnel** : 1 journée pour un opérateur formé aux techniques classiques de microbiologie.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2008 avec 12 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Salmonella* Enteritidis aux 3 niveaux suivants :

- niveau 0 : 0 UFC/ml
- niveau 1 : 3 UFC/ml
- niveau 2 : 30 UFC/ml

Les laboratoires ont testé, par les **deux méthodes, 8 réplicats** pour **chaque niveau** de contamination, soient 24 analyses par laboratoire participant, soit 288 analyses au total.

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 | 96 | 96 | 88 | 87 | 88 | 1 | 0 |
| 1 | 96 | 96 | 88 | 6 | 12 | 82 | 76 |
| 2 | 96 | 96 | 88 | 1 | 1 | 87 | 87 |

* Les résultats d'un laboratoire collaborateur ont dûs être exclus car le protocole de la méthode alternative n'a pas été respecté.

Calculs

- L'exactitude relative est de **92 %**
- La spécificité est de **100%**
- La sensibilité est de **92,6%**

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 96\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 92\%$$

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** :

| Niveau de contamination | Degré d'accord | Concordance | COR |
|-------------------------|----------------|-------------|------|
| L0 | 100 | 100 | 1,00 |
| L1 | 78 | 78 | 1,00 |
| L2 | 98 | 98 | 1,00 |

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

| Niveau de contamination | Degré d'accord | Concordance | COR |
|-------------------------|----------------|-------------|------|
| L0 | 98 | 98 | 1,00 |
| L1 | 90 | 87 | 1,30 |
| L2 | 98 | 98 | 1,00 |

Conclusion

La variabilité de la méthode alternative (degré d'accord, concordance, odds ratio) est comparable 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