



**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 : RBP-31/01-06/08

Date de validation : 30.06.2008

Fin de validité : 30.06.2012

Fabricant et R-BIOPHARM AG
Distributeur Landwehrstr. 54
D-64293 Darmstadt
Allemagne

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

RIDASCREEN® Salmonella

Référence du protocole : RIDASCREEN® Salmonella 08-09-30

DOMAINE D'APPLICATION

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

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune

METHODE DE REFERENCE

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

A handwritten signature in black ink, appearing to read "J. Beslin", written over a horizontal line.

**Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN**

AFNOR Certification

11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France
Tél +33 (0)1 41 62 80 00 – Fax +33 (0)1 49 17 90 00
certification@afnor.org - www.afnor-validation.org

PRINCIPE DE LA METHODE

Le test RIDASCREEN® Salmonella est basé sur une réaction immuno-enzymatique de type ELISA. Les résultats peuvent être lus visuellement ou par un lecteur de microplaques.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode alternative doivent être confirmés soit :

- A partir du bouillon de pré-enrichissement, selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification).
- A partir du bouillon *Salmonella* selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification). Les bouillons sélectifs peuvent être utilisés lorsque le bouillon *Salmonella* ne permet pas de rendre le résultat *Salmonella*.
- A partir du bouillon de pré-enrichissement, selon toute autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION, de principe différent de celui de la méthode RIDASCREEN® Salmonella, en respectant les conditions spécifiées dans la notice technique du fabricant.

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.

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 2007 et 2008 sur 380 échantillons de produits dont 46 naturellement contaminés, 143 artificiellement contaminés et 191 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits laitiers, produits carnés, produits de la mer et végétaux, divers, aliments pour animaux et prélèvements d'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 = 184 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 1 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 4 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 191 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

(3) dont 30 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, non confirmés

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

- Exactitude relative : **AC = 99%**

- Spécificité relative : **SP = 99%**

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

- Sensibilité relative : **SE = 98%**

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 :

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

Méthode de référence :

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

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2007 et 2008, sur les six combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : Produits laitiers, produits carnés, produits de la mer et végétaux, divers, aliments pour animaux et prélèvements 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	<i>S.typhimurium</i>	0,8 [0,5 – 1,3]	0,6 [0,4 – 0,8]
Lait cru	<i>S.dublin</i>	0,7 [0,4 – 1,3]	0,7 [0,4 – 1,3]
Filet de lieu noir	<i>S.enteritidis</i>	0,7 [0,4 – 1,0]	0,7 [0,5 – 1,1]
Œufs entiers	<i>S.enteritidis</i>	0,7 [0,5 – 1,0]	0,7 [0,5 – 1,0]
Pâtée pour chat	<i>S.infantis</i>	0,9 [0,5 – 1,4]	0,8 [0,5 – 1,3]
Eau de process	<i>S.typhimurium</i>	0,5 [0,3 – 0,6]	0,5 [0,4 – 0,7]

(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 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 0,3 et 1,4 UFC/25 g.

Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,4 et 1,3 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 75 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 75 testées.
- L'étude de 33 souches non *Salmonella* a montré des réactions croisées avec deux souches de *Citrobacter freundii*

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en trois à sept jours avec la méthode alternative contre cinq à sept jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en un jour avec la méthode alternative contre cinq à sept 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 trois à sept jours

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2008 avec quinze 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 :

- 0 UFC /25ml
- 3 UFC /25ml
- 30 UFC /25ml

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

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	120	112	96	95	96	1	0
1	120	112	96	2	5	94	91
2	120	112	96	0	0	96	96

*Un laboratoire n'a pas reçu les échantillons dans les délais

**Deux laboratoires ont rencontré des problèmes de manipulation

Calculs

- L'exactitude relative est de 99%
- La spécificité est de 100%
- La sensibilité est de 98%

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 :

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

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 :

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

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1,0
L1	91%	84%	1,9
L2	100%	100%	1,0

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	98%	98%	1,0
L1	95%	90%	1,1
L2	100%	100%	1,0

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