



**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 : RAY-32/01-06/08

Date de validation :	30.06.2008
Date d'extension :	04.02.2010
Fin de validité :	30.06.2012

La Société **RAYAL LTD**
(siège social) Mansfield i-centre
Oakham Business Park
Hamilton Way Mansfield
NG18 5BR
United Kingdom

Site de **BIOLINE ApS**
production Fredericiavej 414
DK- 7080 BORKOP
Denmark

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

RAYAL Salmonella SELECTA

Référence du protocole : Royal Salmonella Selecta-QCF30 – Issue 3

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) Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp.

**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

La méthode RAYAL *Salmonella* SELECTA repose sur un test immuno-enzymatique de type sandwich utilisant une plaque de microtitration sensibilisée avec des anticorps spécifiques, dirigés contre les antigènes flagellaires et somatiques de *Salmonella* et des réactifs prêts à l'emploi. Ce test permet la détection des *Salmonella* mobiles et immobiles, après les étapes d'enrichissement et un choc thermique libérant les antigènes des *Salmonella* éventuellement présentes dans l'échantillon à analyser.

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 d'enrichissement SELECTA non chauffé de l'une des manières suivantes :

- soit selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification).
- soit par identification sur galeries miniaturisées sans purification (si les colonies sont suffisamment isolées).

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé par les tests décrits 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/ La Validation initiale de la méthode *Salmonella* SELECTA, pour la société Bioline, sous le numéro d'attestation BLN 26/01 03/04, date de mars 2004.

L'étude de Validation menée en 2008 et faisant l'objet de la présente attestation, a été réalisée selon la norme EN ISO 16140.

Les résultats de l'étude préliminaire de 2004 portant sur l'exactitude relative, la spécificité relative et la sensibilité relative ont été repris et complétés. Les résultats de l'étude d'inclusivité/exclusivité de 2004 ont été repris. L'étude interlaboratoire a été entièrement refaite.

Lors de cette étude, plusieurs modifications ont été testées :

- L'intégration d'un cas de confirmation concernant l'identification sans purification préalable si la colonie est suffisamment isolée
- La possibilité de conserver le bouillon SELECTA pendant 48 heures à 5°C +/- 3°C avant la réalisation du test immuno-enzymatique
- La possibilité de réaliser la dernière incubation du test immuno-enzymatique (avant l'ajout de la solution stop), indifféremment pendant 15 ou 30 minutes à 20-25°C.

2/ En février 2010, le bureau technique AFNOR VALIDATION a voté positivement pour étendre le champ d'application de la méthode RayAl *Salmonella* SELECTA à la détection des *Salmonella* immobiles, sur la base de résultats tierce-partie obtenus lors de la précédente étude de validation et l'expertise de résultats internes.

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 et en 2008 sur un total de 555 échantillons de produits dont 64 naturellement contaminés, 161 artificiellement contaminés et 330 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits laitiers, produits carnés, divers (ovoproduits, pâtisseries, etc.), produits de la pêche et végétaux, 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 = 214 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 4 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 7 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 330 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) et (3) dont aucun résultat positif de test immuno-enzymatique non confirmé

Note : Parmi les échantillons faux négatifs obtenus lors de l'étude, trois sont issus de la catégorie produits carnés et sont naturellement contaminés.

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

- Exactitude relative : **AC = 97,6%**
- 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 = 96,8%**

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 96,9\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 98,2\%$$

Conclusion

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

$$PD = 4, ND = 7 \text{ donc } Y = PD + ND = 11, ; 6 \leq Y \leq 22 \quad m = 4, M = 1 \quad \text{donc } m > M$$

Conclusion

Les deux méthodes ne sont pas différentes en termes statistiques.

Conservation des bouillons SELECTA à 2-8°C pendant 48 heures :

Pour tous les échantillons testés, le résultat après conservation est identique au résultat obtenu directement après incubation.

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 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, divers (ovoproduits, pâtisseries, ...), produits de la pêche et végétaux, 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 de volaille	<i>Salmonella hadar</i>	0,9 [0,5 – 1,5]	0,7 [0,4 – 1,2]
Lait cru	<i>Salmonella typhimurium</i>	0,5 [0,3 – 0,9]	0,5 [0,3 – 0,8]
Coule d'œufs	<i>Salmonella enteritidis</i>	0,4 [0,2 – 0,7]	0,4 [0,2 – 0,7]
Filet de poisson	<i>Salmonella virchow</i>	0,5 [0,3 – 1,0]	0,5 [0,3 – 1,0]
Pâtée pour chien	<i>Salmonella senftenberg</i>	0,8 [0,4 – 1,3]	0,8 [0,4 – 1,3]
Eau de process	<i>Salmonella newport</i>	0,5 [0,3 – 0,8]	0,5 [0,3 – 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 0,2 et 1,5 UFC/25 g.
Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,2 et 1,3 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE (étude de 2004)

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 55 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 55 testées.
- L'étude de 30 souches non *Salmonella* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées, après passage en bouillon SELECTA.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en trois à six 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 trois 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 six jours.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2008 avec 15 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 :

- 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	112	112	109	0	3
1	120	112	112	0	2	112	110
2	120	112	112	0	0	112	112

*Un laboratoire n'a pas communiqué ses résultats

Calculs

- L'exactitude relative est de 98,5%
- La spécificité est de 97,3%
- La sensibilité est de 99,1%

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

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 inclut les positifs supplémentaires de la méthode alternative) :

Méthode alternative :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 99,1\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 98,7\%$$

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 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	95,3%	94,7%	1,13
L1	97,3%	96,4%	1,35
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	100%	100%	1,0
L1	100%	100%	1,0
L2	100%	100%	1,0

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