



**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 : BKR 23/04 – 12/07

Date de validation :	04.12.2007
Date d'extension :	02.07.2009
Fin de validité :	04.12.2011

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

SOLABIA S.A.S.
Division BOKAR DIAGNOSTICS
29 rue Delizy
93698 PANTIN cedex

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

SESAME *Salmonella* TEST®

Références du protocole :

SESAME *Salmonella* Détection pré-coulé : BM141-150/F/2009-07:1
SESAME *Salmonella* TEST : BT009/F/2007-12:5
COMPASS® *Salmonella* Agar : BM066/F/2003-03:8

DOMAINE D'APPLICATION

Produits d'alimentation humaine et animale et échantillons d'environnement (hors échantillons de production primaire).

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

La méthode est destinée à la détection des salmonelles mobiles et n'est pas adaptée à la détection des *Salmonella* immobiles (souches immobiles ou ayant perdu leur mobilité).

METHODE DE REFERENCE

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

**Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN**

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode SESAME *Salmonella* TEST[®] comprend une étape de pré-enrichissement dans SESAME *Salmonella* Enrichissement incubé pendant 18h, suivie d'un ensemencement sur SESAME *Salmonella* Détection. Ce dernier permet de sélectionner les salmonelles sur leur capacité à migrer et à produire un halo opaque après 24h d'incubation. La flore annexe est inhibée par des agents spécifiques.

Une étape de confirmation peut avoir lieu sur COMPASS[®] *Salmonella* Agar, qui est une gélose contenant deux substrats chromogènes, permettant la mise en évidence de l'estérase par l'obtention d'un précipité magenta et la mise en évidence de la β -glucosidase par l'obtention d'un précipité bleu.

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

- à partir du bouillon d'enrichissement selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification) ;
- en utilisant sans étape de purification COMPASS[®] *Salmonella* Agar selon les instructions dans la notice du fabricant ;
- en mettant en œuvre toute autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION, de principe différent de celui de SESAME *Salmonella* TEST[®].

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

Note (historique de validation)

En 2009, de nouveaux essais ont permis d'étendre la validation aux boîtes pré-coulées de SESAME *Salmonella* Détection. Ce nouveau format pré-coulé a été comparé au format prêt-à-l'emploi de SESAME *Salmonella* TEST[®], initialement validé. Les paramètres suivants ont été testés : exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative, ainsi qu'inclusivité. Les résultats obtenus sont comparables entre les deux formats.

Au cours de cette étude d'extension, un total de 152 échantillons ont été analysés tous formats confondus (pré-coulé et prêt-à-l'emploi). 32 échantillons positifs par la méthode alternative mais non confirmés ont été obtenus, dont 20 provenant de l'analyse d'échantillons de la catégorie prélèvements d'environnement (20 sur gélose au format pré-coulé et 15 sur gélose au format prêt-à-l'emploi).

Ces données ne sont pas détaillées dans la présente 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 2007 sur 401 échantillons de produits dont 50 naturellement contaminés, 148 artificiellement contaminés et 203 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits laitiers, produits carnés, produits de la mer, végétaux et divers, ovoproduits, produits d'alimentation animale 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 = 186 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 6 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 6 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 203 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

(3) dont 18 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

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

- Exactitude relative : **AC = 97,0%**
- Spécificité relative : **SP = 97,1%**

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

- Sensibilité relative : **SE = 96,9%**

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 97,0\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 97,0\%$$

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

PD = 6 , ND = 6 donc Y = PD + ND = 12 ; $6 \leq Y \leq 22$ m= 6, M= 2 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 2007, 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, végétaux et divers, produits d'alimentation animale 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
Steack haché	<i>Salmonella</i> Infantis	0,3 [0,1 – 1,0]	0,3 [0,1 – 1,0]
Lait cru	<i>Salmonella</i> Typhimurium	0,3 [0,1 – 1,0]	0,3 [0,1 – 1,0]
Filet de cabillaud	<i>Salmonella</i> Saintpaul	0,8 [0,5 – 1,2]	0,8 [0,5 – 1,2]
Coule d'oeuf	<i>Salmonella</i> Enteritidis	0,3 [0,1 – 1,0]	0,2 [0,1 – 0,6]
Boulettes pour chat	<i>Salmonella</i> Agona	0,4 [0,2 – 1,0]	0,4 [0,2 – 1,0]
Eau de process	<i>Salmonella</i> Derby	0,3 [0,1 – 1,1]	0,3 [0,1 – 1,1]

(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 et de la méthode de référence se situent entre 0,1 et 1,2 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 62 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 62 testées.
- L'étude de 35 souches non *Salmonella* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées. Deux souches d'*Enterobacter sakazakii* ont donné des colonies de couleur ardoise avec un halo magenta sur COMPASS® *Salmonella* Agar.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

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

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2007 avec treize laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Salmonella* Typhimurium aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC/ml
- 1 – 10 UFC/ml
- 5 – 50 UFC/ml

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	104	104	88	87	87	1	1
1	104	104	88	2	2	86	86
2	104	104	88	0	0	88	88

* Deux laboratoires ont été exclus de l'interprétation statistique pour les raisons suivantes :

- l'un a réalisé les analyses après le délai imparti, et uniquement avec la méthode alternative
- l'autre a obtenu 6 échantillons non contaminés positifs en méthode de référence et un en méthode alternative : des contaminations croisées ont été suspectées.

Calculs

- L'exactitude relative est de 100 %
- La spécificité est de 98,9 %
- La sensibilité est de 99,4 %

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 interlaboratoire sont comparables à ceux obtenus lors de l'étude préliminaire

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** et pour la **méthode de référence** :

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	98,0%	97,7%	1,0
L1	96,0%	95,5%	1,0
L2	100%	100%	1,0

Conclusion

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