



**Méthodes alternatives d'analyse pour l'agroalimentaire  
Performances analytiques certifiées**

**ATTESTATION DE VALIDATION DE METHODE ALTERNATIVE D'ANALYSE  
SUIVANT LA NORME EN ISO 16140 : 2003**

N° attestation : BKR 23/07 – 10/11

Date de validation : 07.10.2011

Fin de validité : 07.10.2015

La Société **SOLABIA SAS**  
29, rue Delizy  
93698 PANTIN Cedex, France

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

**IRIS *Salmonella***<sup>®</sup>

Référence du protocole : BM160/F/2011-02 :2

**DOMAINE D'APPLICATION**

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

**RESTRICTIONS**

Aucune.

**METHODE DE REFERENCE**

**NF EN ISO 6579 (2002)** – Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche de *Salmonella spp.*

Directrice Générale  
Florence MÉAUX



**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

[www.afnor.org](http://www.afnor.org) - [www.afnor-validation.org](http://www.afnor-validation.org)

## PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode IRIS *Salmonella*® est basée sur la combinaison d'un enrichissement en eau peptonée supplémentée (IRIS *Salmonella*® Enrichissement) et d'un isolement sur gélose sélective (IRIS *Salmonella*® Agar).

Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode alternative doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

- Selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO à partir de colonies isolées (en incluant l'étape de purification)
- Par mise en œuvre du test Latex CONFIRM' *Salmonella*

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé par les options décrites ci-dessus, et en particulier par les tests Latex), le laboratoire devra mettre en œuvre 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 2011 sur 389 échantillons de produits dont 49 naturellement contaminés, 144 artificiellement contaminés et 196 non contaminés, appartenant à la catégorie :

- Produits carnés
- Produits laitiers
- Végétaux, produits de la pêche et divers
- Ovoproduits
- Produits d'alimentation animale
- Environnement (hors production primaire)

Les deux temps d'incubation de la méthode alternative ont été testés.

Tous les échantillons ont été analysés **en simple** par les **deux méthodes**.

**Incubation 16 heures - Tableau de résultats** (Cf. tableau 1 de la norme EN ISO 16140) :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 153 <sup>(1)</sup>	Déviations positives A+ / R- PD = 18 <sup>(1)</sup>
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 22 <sup>(2)</sup>	Accord négatif A- / R- NA = 196 <sup>(3)</sup>

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

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

**Incubation 24 heures - Tableau de résultats** (Cf. tableau 1 de la norme EN ISO 16140) :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 154 <sup>(1)</sup>	Déviations positives A+ / R- PD = 18 <sup>(1)</sup>
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 21 <sup>(2)</sup>	Accord négatif A- / R- NA = 196 <sup>(3)</sup>

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) (3) dont 1 échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

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

	Incubation 16 heures	Incubation 24 heures
Exactitude relative : <b>AC</b>	89,7%	90,0%
Spécificité relative : <b>SP</b>	91,6%	88,0%
Sensibilité relative : <b>SE</b>	87,4%	91,6%

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

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)	Méthode de référence : (PA + ND) / (PA + PD + ND)
Incubation 16 heures	88,6%	90,7%
Incubation 24 heures	89,1%	90,7%

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

Temps d'incubation 16 h

PD = 18, ND = 22, Y = PD + ND = 40 ; Y > 22

Test de Mc Nemar :  $X^2 = d^2/Y$ , avec  $d = |PD - ND| = 4$  ;  $X^2 = 0,400$  ; donc  $X^2 < 3,841$

Temps d'incubation 24 h

PD = 18, ND = 21, Y = PD + ND = 39 ; Y > 22

Test de Mc Nemar :  $X^2 = d^2/Y$ , avec  $d = |PD - ND| = 3$  ;  $X^2 = 0,231$  ; donc  $X^2 < 3,841$

### **Conclusion**

Les deux méthodes ne sont pas différentes à  $\alpha < 0,05$ .

### **Essais de conservation des géloses pendant 72 heures à 2-8°C**

Afin d'évaluer la possibilité de conserver les géloses IRIS Salmonella au froid pendant 72h après lecture, un deuxième isolement a été réalisé à partir de l'eau peptonée tamponnée incubée 16 h à 41,5°C. Les géloses ont été lues avant et après stockage.

Une seule modification a été observée pour un échantillon pour lequel aucune colonie typique n'avait été observée avant stockage et des colonies typiques pâles sont apparues après stockage au froid de la boîte. Les colonies ont été identifiées à *Escherichia coli*.

### **Essais de conservation des bouillons d'enrichissement pendant 72 heures à 2-8°C**

Les enrichissements des échantillons positifs et discordants ont été conservés 72 h à 2 – 8°C avant d'être ré-isolés sur gélose IRIS *Salmonella*®, pour valider la possibilité de différer la réalisation du test.

Six changements de résultats sont observés :

- 4 échantillons positifs concordants deviennent discordants négatifs,
- 1 échantillon discordant négatif devient concordant positif,
- 1 échantillon discordant positif devient concordant négatif.

Ces changements n'ont pas d'incidence sur l'analyse des discordants ; les deux méthodes ne sont pas différentes.

## NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2011, sur les 6 combinaisons « produit alimentaire/souche » décrites dans le tableau ci-dessous.

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 <sub>50</sub> (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Steak haché	<i>Salmonella</i> Typhimurium	0,6 [0,4 – 0,8]	0,5 [0,3 – 0,7]
Lait cru	<i>Salmonella</i> Infantis	0,8 [0,4 – 1,5]	0,5 [0,3 – 0,9]
Filet de poisson	<i>Salmonella</i> Derby	0,4 [0,2 – 0,7]	0,7 [0,4 – 1,2]
Coule d'œuf	<i>Salmonella</i> Enteritidis	0,7 [0,4 – 1,5]	0,4 [0,3 – 0,8]
Croquettes pour chien	<i>Salmonella</i> Agona	1,2 [0,7 - 2,0]	0,8 [0,4 - 1,5]
Eau de lavage	<i>Salmonella</i> Senftenberg	0,8 [0,5 - 1,4]	0,6 [0,4 – 1,0]

(3) LOD<sub>50</sub> : 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 10<sup>th</sup> December, 2003"

### Conclusion

Le niveau de détection de la méthode alternative se situe entre 0,2 et 2,0 UFC/25 g.

Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,3 et 1,5 UFC/25 g.

## INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

### Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- 58 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 58 testées. 5 souches ont donné des colonies pâles et parfois plus petites sur gélose IRIS *Salmonella*® Agar (*Salmonella* *diarizonae* Ad 1280, *Salmonella* *Gallinarum* 1 et 2, *Salmonella* *houtenae* Ad 597). Toutes les souches ont donné un test latex positif avec le *Salmonella* Latex Test d'OXOID et 3 souches (*Salmonella* *Gallinarum* 1 et 2, et *Salmonella* *Paratyphi* A ATCC 9150) ont donné un résultat latex négatif avec le kit CONFIRM® *Salmonella*.
- L'étude de 30 souches non *Salmonella* n'a pas mis en évidence de réactions croisées.

## PRATICABILITE

### Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- Délai d'obtention des résultats :
  - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 2 jours avec la méthode alternative, contre 4 à 6 jours avec la méthode de référence.
  - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours avec la méthode alternative, contre 3 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 2 jours.

## ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2011 avec 17 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de viande de boeuf hachée, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Salmonella* Typhimurium aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC/25 ml,
- 1 – 10 UFC/25 ml
- 5 – 50 UFC/25 ml

Les laboratoires ont testé, par les **deux méthodes**, **8 réplicats** pour **chaque niveau** de contamination, soient 48 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	136	136	120	119	120	1	0
1	136	136	120	0	0	120	120
2	136	136	120	0	0	120	120

\* Les résultats de trois laboratoires n'ont pas été retenus pour l'interprétation (la température de conservation des échantillons n'était pas conforme pour l'un et pour cause d'intercontamination d'échantillons pour les deux autres)

### Calculs

- L'exactitude relative est de 99,7%
- La spécificité est de 100,0%
- La sensibilité est de 100,0%

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 supérieurs 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 :

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

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100,0%	99,2%	1,00
L1	100,0%	100,0%	1,00
L2	100,0%	100,0%	1,00

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	97,8 %	98,3%	1,00
L1	100,0 %	100,0%	1,00
L2	100,0 %	100,0%	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](http://www.afnor-validation.org)