



**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 : TEC – 24/02 – 04/03

Date de validation : 02.04.2003

Date de reconduction* : 28.09.2007

Fin de validité : 02.04.2011

** Le protocole NF EN ISO 16140 a été mis en œuvre lors de la reconduction en 2007*

La Société **3M Health Care**
(siège social) Microbiology products
2501 Hudson Road
Building 275 5W 05
MN 55144 – IWO - St Paul –
USA

Distributeur **Laboratoires 3M Santé**
Département Microbiologie
Boulevard de l'Oise
95029 Cergy-Pontoise Cedex

Site de production **TECRA Pty Ltd**
13 Rodborough Road
FRENCHS FOREST NSW 2086
AUSTRALIE

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

TECRA® ULTIMA™ SALMONELLA

Référence du protocole : AV – 0144 – 1024 – 3

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine et animale

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune

METHODE DE REFERENCE

NF EN ISO 6579 (2002) : Directives générales concernant les méthodes de recherche des *Salmonella*.

**Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN**

AFAQ AFNOR Certification

Siège : 11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France

Bureaux : 116, avenue Aristide Briand – BP 40 – 92224 Bagneux Cedex 6 – France

Tél +33 (0)1 46 11 37 00 – Fax +33 (0)1 46 11 39 40

certification@afaq.afnor.org - www.afnor-validation.org

PRINCIPE DE LA METHODE

Le test TECRA® ULTIMA™ SALMONELLA est basé sur une réaction immuno-enzymatique de type «sandwich», mettant en œuvre des anticorps polyclonaux purifiés préparés à partir d'antigènes flagellaires de salmonelles.

Après un pré-enrichissement sur milieu non sélectif (EPT) et un enrichissement sélectif (RVS), un traitement thermique est réalisé. Suit une réaction ELISA.

Après incubation, en présence de salmonelles, une coloration bleue apparaît, visible à l'œil nu. La lecture peut se faire à l'aide d'un lecteur de microplaque.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue du test TECRA® ULTIMA™ SALMONELLA doivent être confirmés à partir du bouillon d'enrichissement RVS selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN, l'ISO ou l'AFNOR (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, l'ISO ou l'AFNOR), le laboratoire devra mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

NOTE

Depuis la première validation obtenue en 2003, la méthode a été modifiée sur les aspects mineurs suivants : changement du type de matériau pour le flaconnage et remplacement du substrat ABTS par le substrat TMB (changement de couleur de la réaction)

Un complément d'étude préliminaire a été menée en 2007 dans le cadre de la reconduction. Certains résultats de 2002 ont été conservés et réinterprétés selon la norme EN ISO 16140. Il s'agit des études d'exactitude et de praticabilité.

L'étude interlaboratoire a été refaite entièrement en 2007.

EXACTITUDE relative, SPECIFICITE relative, SENSIBILITE relative

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

Les essais effectués en 2002 portaient sur des échantillons de produits laitiers, produits carnés, produits de la mer et végétaux, ovoproduits, aliments pour animaux.

En 2007, un complément d'essai a été effectué sur ces mêmes catégories.

40 échantillons d'alimentation animale, de manière à analyser suffisamment d'échantillons naturellement contaminés.

Au total, 313 échantillons ont été analysés dont 46 naturellement contaminés, 115 artificiellement contaminés et 152 non contaminés.

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 = 156 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 2 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 3 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 152 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) et (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 = 98%**
- 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 :

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

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 98,8\%$$

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 5 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, ovoproduits, aliments pour animaux.

Les produits ont été analysés **6 fois**, par les **deux méthodes**, à **4 à 6 niveaux** de contamination.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Matrice	Souche	Niveau de détection relatif LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Viande hachée	<i>S. typhimurium</i>	0,4 [0,2 – 0,8]	0,4 [0,2 – 0,8]
Saumon fumé	<i>S. enteritidis</i>	0,7 [0,5 – 1,0]	0,7 [0,5 – 1,0]
Lait cru	<i>S. dublin</i>	4,9 [2,2 - 10,9]	2,4 [1,1 – 5,1]
Œufs entiers	<i>S. enteritidis</i>	0,9 [0,4 – 1,7]	0,9 [0,4 – 1,7]
Aliments pour chat	<i>S. infantis</i>	0,9 [0,5 – 1,4]	0,9 [0,5 – 1,4]

(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 10,9 UFC/25 g.

Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,2 et 5,1 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 50 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 33 souches non *Salmonella* a montré des réactions (résultats douteux) avec les souches suivantes : *Proteus mirabilis*, *Enterobacter sakazakii*, *Citrobacter koserii*, *Citrobacter freundii* (3 souches), *Enterobacter aerogenes*, *Hafnia alvei*. Lorsque le protocole complet de la méthode alternative est mis en oeuvre, les résultats du test sont négatifs pour toutes ces souches.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- Délai d'obtention des résultats :
- L'obtention des résultats **positifs** se fait en 5 à 7 jours avec le test TECRA® ULTIMA™ SALMONELLA, comme pour la méthode de référence.
- L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours avec le test TECRA® ULTIMA™ SALMONELLA 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 7] jours

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2007 avec 13 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
- niveau légèrement supérieur au niveau de détection relatif (3 cellules/25 mL)
- niveau 10 fois supérieur au niveau précédent (30 cellules/25 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	85	85	3	3
1	104	104	88	1	1	87	87
2	104	104	88	0	0	88	88

* 1 laboratoire a reçu les échantillons hors délai. Un autre laboratoire a fourni des résultats aberrants (résultats positifs sur échantillons non contaminés et discordances importantes). Leurs analyses n'ont pas été prises en compte.

Calculs

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

Interprétation

Les résultats de l'étude collaborative 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 :

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

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	95	93	1,4
L1	98	98	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 AFAQ AFNOR Certification
toute réclamation concernant les performances de la méthode validée

AFAQ AFNOR Certification tient à votre disposition
un document de synthèse des études préliminaire et collaborative