

ETUDE DE RECONDUCTION DE LA VALIDATION
AFNOR DU TEST LUMIPROBE 24 *SALMONELLA* POUR
LA DETECTION RAPIDE DES *SALMONELLA* DANS LES
PRODUITS D'ALIMENTATION HUMAINE ET
ANIMALE

RAPPORT DE SYNTHESE

Fabricant : **EUROPROBE**
Le Gemellyon Nord
57, Boulevard Vivier Merle
69429 LYON Cedex 03

Responsable de l'étude : Madame N. MALARRE

Laboratoire expert : **S.S.H.A. – I.S.H.A.**
25, avenue de la République
91300 MASSY

Responsable de l'étude : Monsieur A. BOUBETRA

En vue de la reconduction de la validation AFNOR selon la norme NF EN ISO 16140 du test LUMIPROBE 24 *SALMONELLA* pour la détection des *Salmonella* avec confirmation dans tous produits d'alimentation humaine et animale.

Méthode alternative : test LUMIPROBE 24 *SALMONELLA* pour la détection des *Salmonella* avec confirmation.

Méthode de référence (*): norme NF EN ISO 6579 (2002), méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp.

<u>1</u>	<u>INTRODUCTION.....</u>	<u>4</u>
1.1	Objectif.....	4
1.2	Méthode alternative.....	4
1.3	Méthode de référence (*).....	6
<u>2</u>	<u>RAPPEL DES ETUDES ANTERIEURES.....</u>	<u>7</u>
2.1	Etude réalisée en 2000 : validation pour la catégorie ovo- produits.....	7
2.2	Etude (réalisé en 2001/2002) : extension de la validation.....	7
<u>3</u>	<u>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</u>	<u>8</u>
3.1	Autres validations.....	8
3.2	Publications.....	8
3.3	Bilan des réclamations utilisateurs.....	8
<u>4</u>	<u>ETUDE DE RECONDUCTION.....</u>	<u>8</u>
4.1	Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative de la méthode alternative et la méthode de référence.....	8
4.2	Niveau de détection relatif de la méthode alternative et le méthode de référence.....	12
4.3	Sélectivité.....	13
4.4	Praticabilité.....	13

1 Introduction

1.1 Objectif

L'objectif principal de cette étude est la reconduction de la validation AFNOR du test LUMIPROBE 24 *SALMONELLA*.

Aucune modification n'a été apportée au protocole depuis l'obtention de l'extension tous produits d'alimentation humaine et animale.

1.2 Méthode alternative

Le LUMIPROBE 24 *SALMONELLA* est une méthode assurant la détection rapide et spécifique de *Salmonella* dans tous types d'échantillons. Après un pré-enrichissement de 6 à 8 heures en bouillon RM à $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ et un enrichissement sélectif de 17 à 19 heures à $(41.5 \pm 1) ^\circ\text{C}$, la présence de *Salmonella* est révélée par un test d'hybridation ADN /ARN ribosomal en phase solide.

Le test LUMIPROBE 24 *SALMONELLA* est basé sur une réaction d'hybridation de sondes nucléiques en phase solide. L'ARN ribosomal de la bactérie cible est libéré par lyse cellulaire et capturé par un oligonucléotide spécifique adsorbé sur un support. L'ARN ribosomal ainsi capturé est hybridé avec un deuxième oligonucléotide marqué qui permettra la révélation par une réaction de chemiluminescence.

Interprétation des résultats :

Valeur RLU de l'échantillon > valeur seuil \Rightarrow résultat positif

Valeur RLU de l'échantillon = valeur seuil \Rightarrow résultat négatif

$$\text{Valeur seuil} = [\text{Valeur en RLU du contrôle négatif}] \times 2$$

Figure 1 : Protocole de la méthode alternative

ETAPE 1 : ENRICHISSEMENT

X g (mL) d'échantillon + 9X mL de bouillon RM préchauffé à (45 ± 1) °C

Incubation à (37 ± 1) °C de 6 à 8 heures

Transférer 1 mL de bouillon RM incubé dans 100 mL de RV

Incubation (41.5 ± 1) °C de 17 à 19 heures

β

ETAPE 2 : LYSE CELLULAIRE (1)

Transférer 100 μL de bouillon RV incubé dans 100 μL de tampon de lyse

Incubation à (37 ± 1) °C pendant 10 minutes

β

ETAPE 3 : HYBRIDATION (1)

Ajouter 300 μL de tampon d'hybridation et incuber 60 minutes à (37 ± 1) °C.

Rincer 4 fois avec le tampon de lavage

β

ETAPE 4 : REACTION AVEC LE CONJUGUE (1)

Ajouter 100 μL de solution de conjugué et incuber 25 minutes à (37 ± 1) °C.

Rincer 4 fois avec le tampon de lavage

↓

ETAPE 5 : AJOUT DU SUBSTRAT (1)

Ajouter 100 μL de substrat et incuber 15 minutes à température ambiante

↓

Lire les résultats au moyen d'un luminomètre

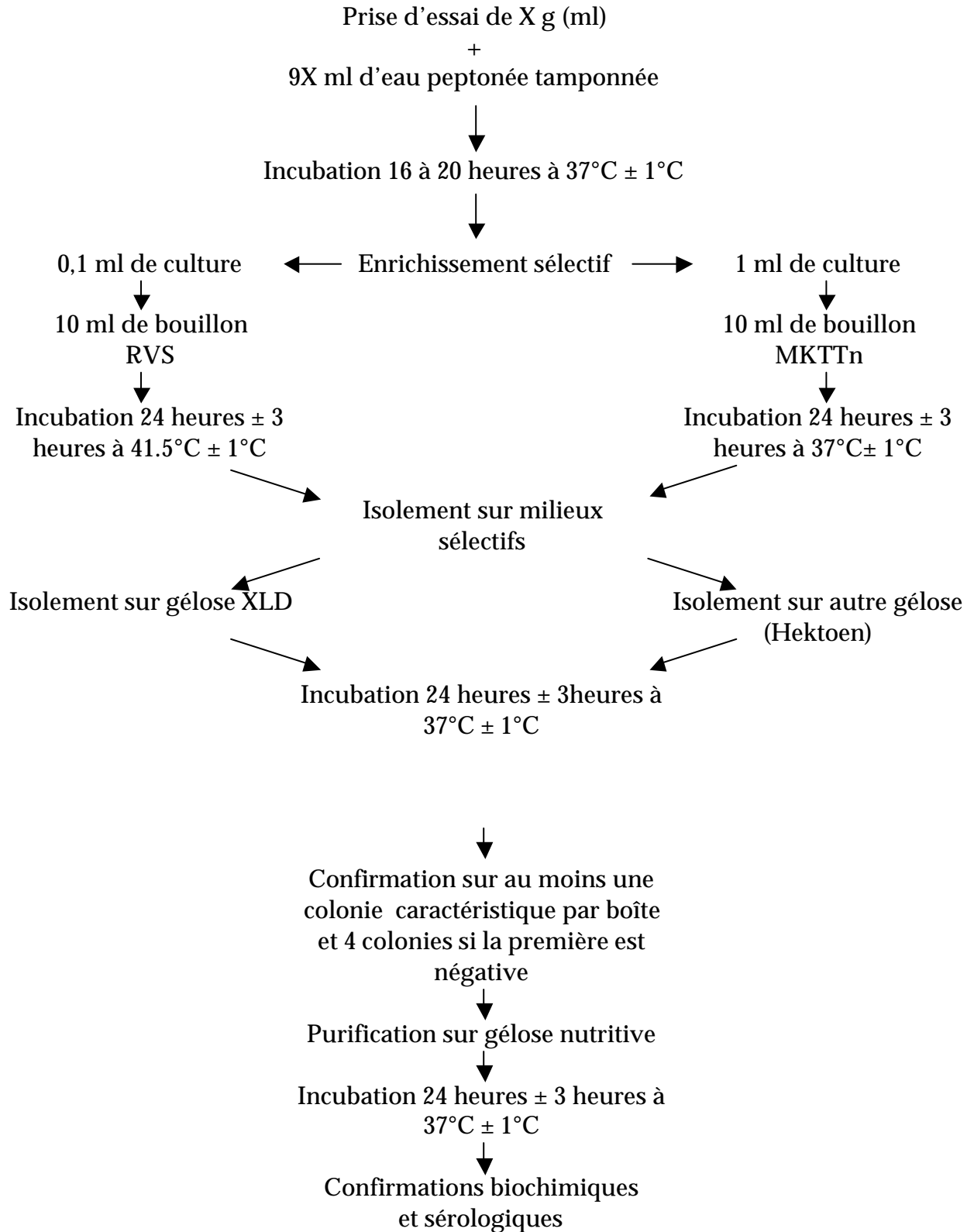
**Si le test est positif, la confirmation est effectuée à partir du bouillon RV:
des isolements sont réalisés sur les milieux XLD et Hektoen**

(1) volumes pour des tests en tube

1.3 Méthode de référence (*)

Norme NF EN ISO 6579 (2002), méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp.

Figure 2 : protocole de la méthode de référence



2 Rappel des études antérieures

2.1 Etude réalisée en 2000 : validation pour la catégorie ovo-produits.

Praticabilité de la méthode alternative

Les 13 critères décrits dans les exigences relatives aux études préliminaire et collaborative ont été renseignés.

Spécificité de la méthode alternative

L'étude a porté sur 50 souches cibles et 30 souches non cibles. Les 50 souches *Salmonella* testées ont donné une réponse positive. Parmi 30 souches non cible, des réactions croisées ont été observées avec des souches de *Citrobacter diversus*, et *Enterobacter sakasaki*. Des essais complémentaires réalisés sur un nombre important de souches des espèces ayant données des réactions croisées, ont donné des réponses négatives en suivant le protocole de la méthode alternative.

Limite de détection intrinsèque de la méthode alternative

Le seuil de détection du test LUMIPROBE 24 SALMONELLA se situe aux environs de $5.0 \cdot 10^5$ cellules / mL.

Limite de détection de la méthode alternative et de la méthode de référence

La catégorie ovoproduit (coule d'œuf) et 4 sérovars de *Salmonella* ont été testés par les deux méthodes en utilisant 5 taux de contamination. Les résultats ont montré une concordance totale entre les 2 méthodes. Le taux d'inoculation compris entre 1 et 10 cellules par 25 g a été détecté par le méthode alternative.

Etude de justesse

L'étude de justesse a donné un pourcentage de concordance, entre les deux méthodes, de 97 %. Un résultat faux négatif et un résultat positif supplémentaire ont été obtenus.

Etude collaborative avec la matrice coule d'œuf

Dix laboratoires ont participé à l'étude collaborative. Les résultats ont montré que la méthode alternative est fidèle à 100%.

2.2 Etude (réalisé en 2001/2002) : extension de la validation

L'extension de la validation aux autres catégories d'aliments a intégré la modification des durées des étapes d'enrichissement.

Praticabilité de la méthode alternative

Les 13 critères décrits dans les exigences relatives aux études préliminaires et collaborative ont à nouveau été renseignés.

Limite de détection de la méthode alternative et de la méthode de référence

Trois catégories d'aliments (lait cru, viande hachée et céleri) et 4 sérovars de *Salmonella* ont été testés par les deux méthodes en utilisant 5 taux de contamination. Les résultats ont montré une concordance totale entre les 2 méthodes quelles que soient la matrice et la souche testées. Les taux de 4 à 8 cellules par 25 grammes ont été détectés par la méthode alternative.

Etude de justesse

L'étude a porté sur 244 échantillons et le pourcentage de concordance entre les deux méthodes est de 95 %, avec trois résultats faux négatifs et neuf résultats positifs supplémentaires confirmés.

3 Etude bibliographique

3.1 Autres validations

Le test LUMIPROBE 24 SALMONELLA a obtenu la validation NORDVAL le 4 Mars 2003 C/ ISO standard EN 12824, sous la référence 2003-20-5408 00008.

3.2 Publications

Pas de publications enregistrées.

3.3 Bilan des réclamations utilisateurs

Aucune réclamation n'a été enregistrée.

4 Etude de reconduction

L'ensemble des essais de la méthode alternative ont été réalisés avec les limites inférieures des temps d'incubation.

4.1 Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative de la méthode alternative et la méthode de référence

L'objectif de cette étude est d'évaluer les performances des deux méthodes sur des échantillons contaminés ou non contaminés. Les analyses sont réalisées en simple par les 2 méthodes et les échantillons sont répartis dans les principales catégories de produits alimentaires.

METHODES

Chacun des échantillons est analysé en simple par la méthode de référence et la méthode alternative. Les résultats positifs avec la méthode alternative ainsi que les résultats négatifs discordants sont confirmés selon le protocole de la méthode de référence.

Dans le cas de contamination artificielle, plusieurs types de stress ont été utilisés et les suspensions bactériennes ont été inoculées dans la suspension- mère de chaque méthode séparément.

La mesure de l'intensité du stress est donnée par la différence entre un dénombrement en milieu non sélectif (TSA) et un dénombrement en milieu sélectif (XLD).

Cinq catégories d'aliment (matrice) ont été testées : produits carnés, produits laitiers, ovo-produits, produits de la mer & végétaux et alimentation animale.

RESULTATS

Tous les résultats bruts sont résumés dans l'annexe 1.

Au total 300 échantillons ont été analysés par les 2 méthodes. Le nombre d'échantillons artificiellement contaminés atteint 73.33 %. 23 échantillons de viande de volaille crue (produits carnés), 20 échantillons de fromages au lait cru (produits laitiers) et 52 échantillons d'œufs et dérivés (ovo-produits) ont été analysés.

Produits carnés

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	PA= 29	PD= 0
Méthode alternative négative (A-)	ND= 1 PPND = 0	NA= 30 PPNA = 0

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive, PP : présumé positif avant confirmation.

Produits de la mer & végétaux

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	PA= 30	PD= 0
Méthode alternative négative (A-)	ND= 0 PPND = 0	NA= 30 PPNA = 0

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive, PP : présumé positif avant confirmation.

Produits laitiers

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	PA= 25	PD= 1
Méthode alternative négative (A-)	ND= 4 PPND =	NA= 30 PPNA =

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive, PP : présumé positif avant confirmation.

Ovo-produits

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	PA= 30	PD= 0
Méthode alternative négative (A-)	ND= 0 PPND = 0	NA= 30 PPNA = 0

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive, PP : présumé positif avant confirmation.

Echantillons d'alimentation animale

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	PA= 28	PD= 0
Méthode alternative négative (A-)	ND= 2 PPND = 0	NA= 30 PPNA = 0

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive, PP : présumé positif avant confirmation.

L'ensemble des matrices

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	PA= 142	PD= 1
Méthode alternative négative (A-)	ND= 7 PPND = 0	NA= 150 PPNA = 0

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive, PP : présumé positif avant confirmation.

Calcul de l'exactitude relative, de la sensibilité relative et de la spécificité relative

Matrices	PA	NA	ND	PD	N	Exactitude relative AC (%)	N+	Sensibilité relative SE (%)	N-	Spécificité relative SP (%)
Produits carnés	29	30	1	0	60	98	30	97	30	100
Produits de la mer & végétaux	30	30	0	0	60	100	30	100	30	100
Produits laitiers	25	30	4	1	60	92	29	86	31	97
Ovo-produits	30	30	0	0	60	100	30	100	30	100
Alimentation animale	28	30	2	0	60	97	30	93	30	100

PA : accord positif, NA : accord négatif, ND : déviation négative, PD : déviation positive.

AC = (PA+NA)/N x 100%, SE = PA/N+ x 100%, SP = NA/N- x 100%, N+ = PA+ND et N- = NA+PD.

La spécificité relative avant et après confirmation est la même pour l'ensemble des catégories testées.

La sensibilité de la méthode alternative peut être calculé en tenant compte des résultats positifs supplémentaires confirmés [(PA+PD) / N+], ce qui donne une valeur de 90% au lieu de 86% pour les produits laitiers.

Les résultats montrent qu'il existe une concordance totale entre la méthode de référence et la méthode alternative pour les produits de la mer & végétaux et les ovo-produits.

Pour les produits carnés, un résultat faux négatif (ND) a été obtenu avec un échantillon naturellement contaminé (dés de poulet cru).

Pour les produits laitiers, on observe 5 résultats discordants. Quatre résultats faux négatifs (ND) ont été obtenus avec des échantillons artificiellement contaminés (4 fromages dont 3 au lait cru). Des isollements (pour 3 échantillons) à partir du bouillon RV, ont mis en évidence des colonies caractéristiques confirmées sur milieu sélectif. Un résultat positif supplémentaire (PD) a été obtenu avec un échantillon de lait cru contaminé artificiellement.

Pour la catégorie alimentation animale, 2 résultats faux négatifs (ND) ont été obtenus avec un échantillon de farine de viande naturellement contaminé et un échantillon d'aliment pour chèvre artificiellement contaminé. Des isollements à partir du bouillon RV, n'ont pas mis en évidence de colonies caractéristiques sur milieu sélectif.

Ces résultats discordants peuvent être dus soit :

- 1- au seuil de détection non atteint pour la méthode alternative. Des colonies caractéristiques confirmées ont été obtenues avec quelques échantillons
- 2- à la prise d'essai, puisque l'étape de pré-enrichissement des deux méthodes est différente.

Calcul des intervalles de confiance associés au nombre d'échantillons soumis à essai

	Exactitude relative			Sensibilité relative			Spécificité relative		
	N	AC (%)	LCL (%)	N+	SE (%)	LCL (%)	N-	SP (%)	LCL (%)
Produits carnés	60	98	96	30	97	92	30	100	98
Produits de la mer & végétaux	60	100	98	30	100	98	30	100	98
Produits laitiers	60	92	88	29	86	82	31	97	92
Ovo-produits	60	100	98	30	100	98	30	100	98
Alimentation animale	60	97	93	30	93	85	30	100	98

LCL : limite de confiance inférieure à 95% (unilatéral)

Analyse des résultats discordants

Selon la norme NF EN ISO 16140, le nombre de discordants [Y=ND (7) + PD (1)] étant de 8, le test de Nc Nemar doit être réalisé afin de comparer les 2 méthodes. Selon ce test, pour Y=8, la valeur de M est nulle. Avec m=1, $m > M$, le test conclut que les 2 méthodes ne sont pas différentes avec $\alpha < 5\%$.

4.2 Niveau de détection relatif de la méthode alternative et la méthode de référence

METHODE

Cinq couples, aliment - souche de *Salmonella* spp ont été testés :

Souche (origine)	Aliment	Flore totale ^a
S. Enteritidis - S38 (ovo-produit)	Œufs entiers	30
S. Typhimurium - S15 (viande de bœuf)	Viande hachée	4.0 10 ³
S. Dublin - S59 (lait)	Lait cru	6.4 10 ⁴
S. Enteritidis - S63 (moules)	Saumon fumé	1.6 10 ²
S. spp - S65 (farine de viande)	Granulés pour rongeurs	20

a : CFU/mL ou CFU/g

Six niveaux de contamination ont été testés pour chaque couple souche – aliment dont le contrôle négatif.

Six réplicats ont été réalisés pour chaque niveau. Les contaminations ont été réalisées directement dans les bouillons de pré-enrichissement pour chaque méthode, avant incubation.

Des suspensions d'environ 10 cellules par mL (suspension initiale) ont été préparées. A partir de la suspension initiale, des volumes de 1 mL, 0.3 mL et 0.1 mL sont prélevés pour contaminer 25 grammes de produit pour les trois premiers niveaux. En parallèle, la suspension initiale est diluée au demi et au 1/4. Un volume de 0.1 mL de ces 2 suspensions est prélevé pour contaminer 25 grammes de produit. Pour l'ensemble des niveaux de contamination, l'homogénéité des inocula est vérifiée par 30 dénombrements en gélose TSA et le calcul de l'intervalle de confiance selon la loi de Poisson est calculé.

RESULTATS

		Niveau de détection relatif selon le test de Spearman-Kræber	
Souche	Aliment	Méthode de référence (*)	Méthode alternative
S. Enteritidis	Œufs entiers	0.764 ^a [0.474, 1.227]	0.608 [0.361, 1.025]
S. Typhimurium	Viande hachée	1.32 [0.997, 1.761]	1.550 [1.010, 2.380]
S. Dublin	Lait cru	1.930 [1.097, 3.425]	8.178 [5.595, 11.953]
S. Enteritidis	Saumon fumé	0.984 [0.557, 1.737]	0.984 [0.557, 1.737]
S. spp	Granulés pour rongeurs	0.990 [0.560, 1.740]	0.645 [0.383, 1.086]

a : cellules dans 25 g / mL

CONCLUSION

La limite de détection de la méthode alternative varie entre 0.608 CFU / 25 g (mL) [0.361, 1.025] et 8.178 CFU / 25 g (mL) [5.595, 11.953].

Pour la méthode de référence, la limite de détection varie entre 0.764 CFU / 25 g (mL) [0.474, 1.227] et 1.93 CFU / 25 g (mL) [1.097, 3.425].

4.3 Sélectivité

Des essais d'inclusivité, en complément de ceux réalisés dans les validations antérieures, ont été réalisés sur 4 sérovars : *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B* et *S. Paratyphi C*.

METHODES

Les souches testées subissent 2 repiquages successifs avant leurs utilisations. Le dernier repiquage est réalisé dans le bouillon RM. Le niveau d'inoculation varie de 50 à 200 CFU par 25 mL.

RESULTATS

Souche	Origine	Résultat de test
<i>Salmonella Typhi</i>	CIP 54136	Positif
<i>Salmonella Paratyphi A</i>	CIP 5539	Positif
<i>Salmonella Paratyphi A</i>	CIP 5540	Positif
<i>Salmonella Paratyphi B</i>	CIP 54100	Positif
<i>Salmonella Paratyphi B</i>	Sal 19.1, souche sauvage	Positif
<i>Salmonella Paratyphi C</i>	CIP 55108	Positif

CONCLUSION

La méthode LUMIPROBE 24 SALMONELLA est spécifique des 4 sérovars testés

4.4 Praticabilité

Délai d'obtention des résultats

Premier cas : échantillons négatifs

Etape	Méthode alternative	Méthode de référence
Début analyse	J0	J0
Repiquage du pré-enrichissement	J0	J1
Repiquage des bouillons sélectifs	-	J2
Lecture XLD et autre milieu au choix	-	J3
Test d'hybridation	J1	-
Confirmation	-	J5 à J7 ^a

a : identification de la 1^{ère} colonie à J5, puis 48 heures supplémentaires pour les autres colonies

Deuxième cas : échantillons positifs

Etape	Méthode alternative	Méthode de référence
Début analyse	J0	J0
Repiquage du pré-enrichissement	J0	J1
Test d'hybridation	J1	-
Repiquage des bouillons sélectifs	J1	J2
Lecture XLD et autre milieu au choix	J2	J3
Confirmation	J4 à J6	J5 à J7 ^a

a : identification de la 1^{ère} colonie à J5, puis 48 heures supplémentaires pour les autres colonies