

OXOID THERMO FISHER SCIENTIFIC
6 route de Paisy
69571 DARDILLY

Validation AFNOR des méthodes alternatives d'analyse
Application à la microbiologie alimentaire

Rapport de synthèse

Reconduction ISO 16140 du
Salmonella Rapid Test d'OXOID (OSRT)
(Etudes préliminaire et collaborative
conduites selon la norme NF EN ISO 16140)

Méthode qualitative

Confidentiel

Ce rapport comprend 35 pages dont 3 annexes.

La reproduction de ce rapport n'est autorisée que sous sa forme intégrale.

SYNTHESE OSRT (Version 1)

11 décembre 2007

ADRIA DEVELOPPEMENT

Creac'h Gwen - F. 29196 QUIMPER Cedex - Tél. (33) 02.98.10.18.18 - Fax (33) 02.98.10.18.08

E-mail : adria.developpement@adria.tm.fr - Site web : <http://www.adria.tm.fr> - Site réservé adhérents : <http://www.clubiaa.net>
ASSOCIATION LOI DE 1901 - N° SIRET 306 964 271 00036 - N° EXISTENCE 532900006329 - N° TVA FR4530696427100036

Sommaire

1	OBJET	2
2	INTRODUCTION	2
	2.1 Référentiel de validation	2
	2.2 Principe et protocole de la méthode alternative	2
	2.3 Domaine d'application demandé	4
	2.4 Méthode de référence	4
3	ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
4	ETUDE COMPARATIVE	4
	4.1 Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative	4
	4.2 Niveau de détection relatif	11
	4.3 Inclusivité / exclusivité	13
5	ETUDE INTERLABORATOIRES	14
	5.1 Mise en oeuvre	14
	5.2 Contrôle des paramètres expérimentaux	15
	5.3 Résultats des analyses	16
	5.4 Calculs	17
	5.5 Interprétation	19
6	PRATICABILITE	21
7	CONCLUSION	24
<input type="checkbox"/>	<i>Annexe 1 - Méthode alternative</i>	25
<input type="checkbox"/>	<i>Annexe 2 - Méthode de référence</i>	30
<input type="checkbox"/>	<i>Annexe 3 - Résultats bruts de l'inclusivité et de l'exclusivité</i>	31

Avant Propos

L'accréditation du COFRAC atteste de la compétence des laboratoires pour les seuls essais couverts par l'accréditation qui sont identifiés par le symbole[♦].

L'ensemble des renseignements permettant de valider la garantie des analyses est tenu à la disposition de la Société Oxoid Thermo Fisher Scientific.

Les résultats sont synthétisés au sein de tableaux et interprétés selon la norme NF EN ISO 16140.

-
- ✓ **Fabricant :** SOCIETE OXOID
6 route de Paisy
69571 DARDILLY

 - ✓ **Laboratoire expert :** ADRIA Développement
ZA Creac'h Gwen
29196 QUIMPER Cedex

 - ✓ **Méthode à valider :** *Salmonella* Rapid Test Oxoid (OSRT) pour la détection des salmonelles dans les produits alimentaires

 - ✓ **Référentiel de validation :** Norme NF EN ISO 16140 (octobre 2003) : microbiologie des aliments - Protocole pour la validation des méthodes alternatives

 - ✓ **Méthode de référence[♦] :** Norme ISO 6579 (2002) : méthode horizontale pour la recherche de *Salmonella* spp.

 - ✓ **Etendue de la validation :** Tous produits d'alimentation animale et humaine
Echantillons de l'environnement (hors environnement d'élevage)

[♦] ISO 6579 : essai effectué sous le couvert de l'accréditation par le laboratoire expert

1 OBJET

La Société Oxoid Thermo Fisher Scientific souhaite obtenir la reconduction de la validation de la méthode *Salmonella* Rapid Test Oxoid (OSRT) pour la recherche de *Salmonella* spp. mobiles dans les produits d'alimentation humaine et animale selon le référentiel ISO 16140, avec une extension pour les échantillons de l'environnement.

Le changement de référentiel ne permet pas de reprendre la totalité des données acquises en 2003. L'étude a donc porté sur les points suivants :

- étude bibliographique,
- étude comparative des méthodes :
 - * exactitude relative, spécificité relative, sensibilité relative,
 - * niveau de détection relatif,
 - * inclusivité, exclusivité,
 - * étude de praticabilité.
- étude interlaboratoire.

2 INTRODUCTION

2.1 Référentiel de validation

Le référentiel de validation utilisé est la norme NF EN ISO 16140 (octobre 2003) : protocole pour la validation des méthodes alternatives.

2.2 Principe et protocole de la méthode alternative

2.2.1 Principe de la méthode alternative

Le pré-enrichissement d'un échantillon homogénéisé dans un milieu adapté est suivi par l'inoculation, dans un récipient pour la culture, d'un milieu spécial pour *Salmonella* et de deux tubes. Chaque tube contient un milieu sélectif inférieur et un milieu indicateur supérieur, séparés par un filtre poreux.

Salmonella Rapid Test Oxoid (OSRT) permet de réaliser en 40 h (16 h + 24 h) la recherche de *Salmonella* mobiles dans tous types de produits alimentaires.

Les *Salmonella* migrent activement à travers le milieu sélectif inférieur vers le milieu indicateur supérieur où leur présence entraîne un changement de couleur.

Les tubes présentant une réaction positive doivent être testés avec le *Salmonella* Latex Test qui met en évidence la présence d'antigènes somatiques et flagellaires de *Salmonella* par une réaction d'agglutination de particules de latex, par isolement sur gélose sélective et réalisation d'une mini-galerie biochimique.

2.2.2 Protocole d'utilisation

Le mode opératoire est présenté ci-après :

- *pré-enrichissement* : 25g d'échantillon à analyser sont mis à incuber dans 225 ml d'Eau Peptonée Tamponnée (EPT) à 37°C pendant 16-20 heures,
- *réalisation de l'OSRT* : 1 ml de l'échantillon pré-enrichi estensemencé dans le dispositif de culture. Le milieu est alors incubé 24 heures à 41°C ± 1°C.
- *lecture du test* : la présence éventuelle de salmonelles se caractérise par un changement de couleur du milieu indicateur supérieur de l'un ou des deux tubes.
- *confirmation* : deux options de confirmation sont proposées :
 - * à partir du tube positif, isoler sur une gélose sélective au choix (XLD, OSCMII ...), puis effectuer les tests de confirmation classiques.
 - * à partir du tube positif, effectuer un test latex Salmonelle.

Le stockage de l'eau peptonée tamponnée 72 h à 4°C a été évalué sur les échantillons positifs.

2.3 Domaine d'application demandé

Tous produits d'alimentation animale et humaine
Echantillons de l'environnement (hors environnement d'élevage)

2.4 Méthode de référence

La méthode de référence est la norme NF EN ISO 6579 (2002) : méthode horizontale pour la recherche de *Salmonella*. Le protocole est schématisé en Annexe 2.

3 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Aucune référence bibliographique n'a été identifiée dans les bases de données (15 bases de données scientifiques référencées au sein du serveur Dialogue).

4 ETUDE COMPARATIVE

4.1 Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative

L'exactitude est l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée.

La spécificité relative est définie comme le degré auquel la méthode est affectée (ou non) par les autres composants dans un échantillon en contenant plusieurs. C'est la capacité de la méthode à mesurer avec exactitude un analyte donné, ou sa quantité, dans l'échantillon sans qu'il y ait d'interférence avec les composants non ciblés, tels un effet de la matrice ou un bruit de fond.

La sensibilité relative est définie comme la capacité de la méthode alternative à détecter deux quantités différentes d'analyte qui ont été mesurées avec la méthode de référence en utilisant une matrice donnée sur toute l'étendue de mesure. C'est la variation de quantité minimale (accroissement de la concentration d'analyte x) qui donne une variation significative du signal mesuré (réponse y).

4.1.1 **Nombre et nature des échantillons**

Les données acquises en 2003 ont été complétées. 252 échantillons ont été analysés en 2003 et 239 en 2007.

La répartition par catégorie est donnée dans le tableau suivant :

Catégories	Positifs*	Négatifs	Total
Produits carnés	36	42	78
Produits laitiers	32	29	61
Végétaux, produits de la mer, divers	47	46	93
Ovoproduits	35	41	76
Alimentation animale	32	40	72
Echantillons de l'environnement	37	30	67
TOTAL	219	228	447

* : échantillons positifs confirmés par l'une ou l'autre des méthodes

4.1.2 **Contamination artificielle des échantillons**

Des contaminations artificielles ont été réalisées par des inoculations ou des contaminations croisées.

Un total de 108 échantillons a été contaminé ; 96 ont donné un résultat positif par l'une ou l'autre des méthodes, ce qui représente 56,2 % de produits naturellement contaminés.

4.1.3 **Protocoles de confirmation**

Les protocoles de confirmation ont été évalués au cours de cette étude :

- réalisation du test latex directement à partir du kit,
- isolement sur gélose sélective OSCM II puis identification par les tests classiques décrits dans la méthode de référence.

4.1.4 Résultats des essais

Tableau 1 - Couples de résultats des méthodes de référence et alternative

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 207*	Déviations positives (R-/A+) PD = 9
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 3	Accord négatif (A-/R-) NA = 228 PPNA = 8

* Deux échantillons dont le résultat positif a été confirmé par isolement sur gélose sélective et réalisation des tests classiques de confirmation (échantillons 1508 et 1098)

A+ = positifs confirmés

A- = négatifs immédiats **et** négatifs après confirmation quand présomptifs positifs

PA = accord positif

NA = accord négatif

PD = déviation positive

ND = déviation négative

PPN = positif présomptif négatif

Résultats par catégorie d'échantillons

Tableau 2 - Produits carnés

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 35 *	Déviations positives (R-/A+) PD = 1
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 0	Accord négatif (A-/R-) NA = 42 PPNC = 1

* Un échantillon dont le résultat positif a été confirmé par isolement sur gélose sélective et réalisation des tests classiques de confirmation (échantillon 1098)

Tableau 3 - Produits laitiers

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 29	Déviations positives (R-/A+) PD = 2
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 1	Accord négatif (A-/R-) NA = 29 PPNC = 2

Tableau 4 - Produits de la mer, végétaux et divers

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 35*	Déviations positives (R-/A+) PD = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 0	Accord négatif (A-/R-) NA = 41

* Un échantillon dont le résultat positif a été confirmé par isolement sur gélose sélective et réalisation des tests classiques de confirmation (échantillon 1508)

Tableau 5 - Ovoproduits

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 40	Déviations positives (R-/A+) PD = 6
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 1	Accord négatif (A-/R-) NA = 46 PPNC = 2

Tableau 6 - Produits d'alimentation animale

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 31	Déviations positives (R-/A+) PD = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 1	Accord négatif (A-/R-) NA = 40 PPNC = 1

Tableau 7 - Echantillons de l'environnement

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 37	Déviations positives (R-/A+) PD = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 0	Accord négatif (A-/R-) NA = 30 PPNC = 2

Tableau 8 - Calcul de l'exactitude relative (AC), de la sensibilité relative (SE) et de la spécificité relative (SP)

PA = Accord positif (R+/A+)

PD = déviations positives (R-/A+)

NA = Accord négatif (R-/A-)

ND = déviations négatives (A-/R+)

Matrices	PA	NA	ND	PD	N	Exactitude relative AC (%) [100x(PA+NA)]/N	N+ PA + ND	Sensibilité relative SE (%) [100xPA]/N+	N- NA + PD	Spécificité relative SP (%) [100xNA]/N-
Produits carnés	35	42	0	1	78	98,7	35	100,0	43	97,7
Produits laitiers	29	29	1	2	61	95,1	30	96,7	31	93,5
Produits de la pêche, végétaux et divers	35	41	0	0	76	100,0	35	100,0	41	100,0
Ovoproduits	40	46	1	6	93	92,5	41	97,6	52	88,5
Alimentation animale	31	40	1	0	72	98,6	32	96,9	40	100,0
Environnement	37	30	0	0	67	100,0	37	100,0	30	100,0
TOTAL	207	228	3	9	447	97,3	210	98,6	237	96,2

4.1.5 Calcul de l'exactitude relative (AC), de la sensibilité relative (SE) et de la spécificité relative (SP)

Les valeurs en pourcentage calculées pour ces trois critères pour la méthode alternative sont les suivantes :

Exactitude relative	AC = 97,3
Spécificité relative	SP = 96,2
Sensibilité relative	SE = 98,6

La sensibilité, en tenant compte des positifs supplémentaires obtenus pour la méthode alternative, est la suivante :

Méthode alternative	98,6
Méthode de référence	95,9

4.1.6 Analyse des discordants

Le nombre de discordants entre la méthode de référence et la méthode alternative est de :

Y =	3 + 9 = 12
m =	3
M =	2
Conclusion	m > M : les deux méthodes ne sont donc pas différentes.

Les 12 échantillons discordants sont répartis comme suit :

3 DEVIATIONS NEGATIVES	
Produits laitiers (1)	
Echantillon n° 1276 Tomme de Savoie	Echantillon artificiellement contaminé par <i>Salmonella Montevideo</i> 305. Aucune réaction positive n'a été observée au niveau du kit OSRT. Cet échantillon a, par contre, donné un résultat positif par la méthode alternative après conservation de l'EPT 72 h à 4°C. Des colonies suspectes ont été isolées sur les quatre géloses de la méthode de référence.
Ovoproduits (1)	
Echantillon n° 1515 Crème anglaise	Echantillon artificiellement contaminé par <i>Salmonella Enteritidis</i> 657. Aucune réaction positive n'a été observée au niveau du kit OSRT. Ce résultat a été confirmé après conservation de l'EPT 72 h à 4°C. Pour la méthode de référence, seules les géloses issues du RVS ont permis d'isoler des colonies suspectes.
Produits d'alimentation animale (1)	
Echantillon n° 1489 Croquettes pour chien	Echantillon naturellement contaminé pour lequel aucune réaction positive n'a été obtenue par le kit OSRT. Pour la méthode de référence, des colonies suspectes ont été isolées uniquement sur gélose Hektoen à partir du MKTTn. Il s'agit donc probablement d'un échantillon très faiblement contaminé.

9 DEVIATIONS POSITIVES	
Produits carnés (1)	
Echantillon n° 46 Rognon de porc	Echantillon naturellement contaminé analysé en 2003. Aucune colonie suspecte n'avait été mise en évidence par la méthode de référence
Produits laitiers (2)	
Echantillon n° 1854 Lait cru	Echantillon artificiellement contaminé par <i>Salmonella Meleagridis</i> 305, positif à 24 h, retrouvé négatif par la méthode alternative après conservation de l'enrichissement 72 h à 4°C, et alors concordant avec la méthode de référence. Aucune colonie suspecte n'a été isolée par la méthode de référence.
Echantillon n° 1855 Lait cru	Echantillon inoculé par <i>Salmonella Montevideo</i> 510, trouvé positif à 24 h et confirmé après conservation de l'enrichissement 72 h à 4°C. Aucune colonie suspecte n'a été isolée en méthode de référence.
Ovoproduits (6)	
Echantillon n° 10 Coule d'œuf	Echantillon naturellement contaminé, analysé en 2003. Aucune colonie suspecte n'a été trouvée en méthode de référence.
Echantillon n° 11 Coule d'œuf	Echantillon naturellement contaminé, analysé en 2003. Des colonies suspectes ont été isolées sur gélose XLD à partir du RVS, mais elles n'ont pas été confirmées.
Echantillon n° 13 Coule d'œuf	Echantillon naturellement contaminé, analysé en 2003. Aucune colonie suspecte n'a été trouvée en méthode de référence.
Echantillon n° 14 Coule d'œuf	Echantillon naturellement contaminé, analysé en 2003. Aucune colonie suspecte n'a été trouvée en méthode de référence.
Echantillon n° 112 Mayonnaise	Echantillon naturellement contaminé. Des colonies suspectes ont été isolées sur gélose Hektoen à partir du bouillon MKTTn mais elles ont été identifiées comme <i>Proteus Mirabilis</i> . Echantillon non confirmé positif par le kit OSRT après conservation de l'EPT à 4°C.
Echantillon n° 116 Mayonnaise	Echantillon naturellement contaminé. Aucune colonie suspecte n'a été isolée en méthode de référence. Echantillon confirmé positif par le kit OSRT après conservation de l'enrichissement au froid.

4.1.7 Effet de la conservation de l'EPT 72 h à 4°C

Les essais de conservation de l'EPT 72 h à 4°C ont été réalisés uniquement sur les échantillons analysés en 2007 (échantillons ayant donné un résultat positif directement après incubation et échantillons discordants).

Sur 107 résultats positifs obtenus immédiatement après incubation, 3 échantillons ont donné un résultat négatif après conservation de l'EPT 72 h à 4°C ; il s'agit des échantillons 1097 (morceaux de poule), 1112 (mayonnaise) et 1854 (lait cru), échantillons qui étaient positifs supplémentaires à la première analyse.

2 échantillons (1276 - Tomme de Savoie, 1956 - Chiffonnette sol local poubelle), en déviation négative à la première analyse, deviennent concordants après conservation de l'EPT 72 h à 4°C, quel que soit le test de confirmation utilisé.

4.2 Niveau de détection relatif

Le niveau de détection relatif correspond au nombre le plus petit de micro-organismes cultivables qu'il est possible de détecter dans l'échantillon, avec une probabilité de 50 %, à l'aide des méthodes alternative et de référence.

4.2.1 Matrices utilisées

Cette étude a pour objectif de déterminer les quantités minimales de *Salmonella spp.* détectables dans la matrice alimentaire et de les comparer à celles obtenues par la méthode de référence.

Les limites de détection ont été définies par l'analyse du couple (matrice / souche) à quatre niveaux. Six réplicats de chaque condition ont été réalisés.

Les matrices testées étaient les suivantes :

- steak haché / *Salmonella infantis* 14
- poisson cru / *Salmonella Saintpaul* F 31
- coule d'œuf / *Salmonella enteritidis* 2532
- lait cru / *Salmonella typhimurium* 305
- produit d'alimentation animale / *Salmonella agona* A00V038
- eau de process / *Salmonella derby* A00E084.

4.2.2 Protocole de contamination

Les contaminations et les dénombrements ont été réalisés selon le protocole décrit, pour les faibles taux d'inoculation, dans les exigences relatives aux études préliminaires et collaboratives.

4.2.3 Résultats

Tableau 9 - Valeurs des niveaux de détection relatifs

Couples (souche, matrice)	Niveau de détection relatif (UFC / 25 g ou 25 ml) selon le test de Spearman-Kärber ¹ (UFC / 25 g ou 25 ml)		
	Méthode de référence	Méthode alternative (Latex)	Méthode alternative (Isolement)
Steak haché / <i>Salmonella infantis</i> 14	0,3 [0,1 ; 0,8]	0,3 [0,1 ; 0,8]	0,3 [0,1 ; 0,8]
Lait cru / <i>Salmonella typhimurium</i> 305	0,3 [0,1 ; 0,9]	0,3 [0,1 ; 1,0]	0,3 [0,1 ; 1,0]
Filet de cabillaud / <i>Salmonella Saintpaul</i> F31	0,8 [0,5 ; 1,3]	0,8 [0,5 ; 1,3]	0,8 [0,5 ; 1,3]
Coule d'œuf / <i>Salmonella enteritidis</i> 2532	0,3 [0,1 ; 0,3]	0,2 [0,3 ; 0,8]	0,2 [0,3 ; 0,8]
Boulettes pour chats / <i>Salmonella agona</i> A00V038	0,6 [0,3 ; 1,8]	0,6 [0,3 ; 1,8]	0,6 [0,3 ; 1,8]
Eau de process / <i>Salmonella derby</i> A00E084	0,3 [0,1 ; 1,1]	0,3 [0,1 ; 1,1]	0,3 [0,1 ; 1,1]

4.2.4 Conclusion

Les limites de détection de la méthode de référence et de la méthode alternative sont équivalentes, quelle que soit la technique de confirmation utilisée. Elles varient de 0,1 à 1,8 UFC/25 g.

¹ "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".

4.3 Inclusivité / exclusivité

L'inclusivité est la capacité de la méthode alternative à détecter l'analyte cible à partir d'un large éventail de souches.

L'exclusivité est l'absence d'interférences par un éventail approprié de souches non cibles de la méthode alternative.

4.3.1 Protocoles d'essai

Protocole pour l'inclusivité : 53 souches *Salmonella* ont été décongelées et mises en culture en bouillon BHI à 37°C. Les souches ont été inoculées à un taux compris entre 10 et 100 cellules pour 225 ml d'eau peptonée tamponnée. Le protocole complet de la méthode OSRT a ensuite été appliqué.

Protocole pour l'exclusivité : 30 souches négatives ont été décongelées et mises en culture en bouillon BHI à 37°C. Les souches ont ensuite été inoculées à un taux de 10^5 UFC/225 ml d'eau peptonée tamponnée. Le protocole complet de la méthode OSRT a ensuite été appliqué.

4.3.2 Résultats

Les résultats sont donnés en annexe 3.

4.3.3 Conclusion

- Inclusivité

Sur 55 souches testées en inclusivité, 52 ont donné une réaction caractéristique en kit OSRT et un test latex positif. Seules les 3 souches de *Salmonella Paratyphi A* ne se sont pas développées dans le kit. Ces trois souches donnent, par contre, une réaction positive au latex et des colonies caractéristiques sur gélose OSCM II. Enfin, cette souche présente des colonies non caractéristiques sur gélose XLD.

Toutes les souches testées ont donné des colonies caractéristiques violacées sur gélose OSCM II, à l'exception de 4 souches de *Salmonella Dublin* sur 5 testées et de *Salmonella Binza adria 27* qui se présente sous forme de colonies crème à centre violacé.

- **Exclusivité**

Sur les 30 souches testées, aucune n'a donné de réaction positive en kit OSRT.

L'inclusivité et l'exclusivité de la méthode OSRT, avec confirmation par test latex, sont satisfaisantes.

D'après les tests effectués au cours de cette étude, pour la confirmation par la technique d'isolement sur gélose sélective, une absence de réaction caractéristique sur gélose OSCM II est observée pour 4 des souches *Salmonella Dubin* testées. Une réaction faible est observée pour la souche *Salmonella Binza* testée. Par contre, toutes ces souches présentent des colonies caractéristiques sur gélose sélective XLD.

5 ETUDE INTERLABORATOIRES

5.1 Mise en oeuvre

Treize laboratoires ont participé à l'étude qui a porté sur du lait pasteurisé demi-écrémé inoculé par *Salmonella typhimurium* 305.

Tous les échantillons ont été répartis par le laboratoire expert en flacons stériles, à raison de 25 ml par flacon, avant d'être contaminés. Les flacons de lait ont été inoculés individuellement à raison de 8 flacons par taux et par laboratoire. Ainsi, chaque laboratoire a reçu 24 flacons à analyser.

Les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre de la méthode alternative et de la méthode de référence ont été fournis par la Société OXOID.

Les instructions détaillées ont été transmises aux laboratoires par le laboratoire expert.

5.2 Contrôle des paramètres expérimentaux

5.2.1 Taux de contamination avant ensemencement, taux obtenus après contamination artificielle et stabilité des échantillons

✓ *Avant ensemencement*

La recherche de bactéries cibles dans la matrice a été réalisée sur cinq prélèvements afin de s'assurer de l'absence de ces bactéries.

✓ *Taux obtenus après contamination artificielle*

Les taux de contamination obtenus dans la matrice et les estimations de précision sont donnés dans le tableau suivant :

Niveau	Echantillons	Taux théorique ciblé (b/25 ml)	Taux réel (b/25 ml d'échantillon)	Estimation de la limite inférieure de la contamination par 25 ml d'échantillon	Estimation de la limite supérieure de la contamination par 25 ml d'échantillon
Niveau 0	4 - 5 - 6 - 11 - 13 - 14 - 21 - 23	/	/	/	/
Niveau bas	1 - 2 - 7 - 9 - 12 - 15 - 19 - 22	5	6,7	5,8	7,7
Niveau haut	3 - 8 - 10 - 16 - 17 - 18 - 20 - 24	25	19,2	16,7	22,1

✓ *Stabilité des échantillons*

Le dénombrement a été réalisé sur 5 ml de lait pour le taux d'inoculation fort, sur trois flacons. Une recherche a été réalisée pour le taux d'inoculation faible sur trois échantillons. Les résultats sont reportés dans le tableau suivant :

Jour	UFC/25 ml (XLD)			Recherche / 25 ml		
	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3
J0	20	10	10	+	+	+
J1	/	/	/	+	+	+
J2	15	10	25	+	+	+

Aucune évolution du taux d'inoculation n'a été notée.

5.2.2 Température relevée au cours du transport, température à réception et délais de réception

Les températures au cours du transport et mesurées à réception, ainsi que le délai de réception des échantillons sont données dans le Tableau 101.

Tableau 10 - Température des échantillons à réception

Laboratoires	Température relevée par le thermobouton (°C)	Température mesurée à réception (°C)	Date de réception des échantillons
A	0,5	1,6	J1
B	1,5	5,5	J1
C	1,0	2,6	J1
D	1,5	1,3	J1
E	1,0	5,6	J1
F	2,5	4,5	J1
G	Défaut de programmation	5,0	J1
H	1,0	1,0	J1
I	1,5	1,5	J1
J	2,0	2,0	J1
K	0,5	- 0,5	J1
L	3,5	3,5	J1
M	1,5	1,5	J1

Une température de - 0,5°C a été mesurée par le thermobouton pour le laboratoire K à réception du colis ; aucune congélation des échantillons n'a été signalée par le laboratoire.

5.2.3 Conclusion

Aucune anomalie n'a été observée pendant le transport ; la température mesurée pendant le transport était comprise entre - 0,5 et 4°C.

5.3 Résultats des analyses

5.3.1 Dénombrement de la flore aérobique mésophile

Le dénombrement de la flore aérobique mésophile de la matrice a été effectué sur un échantillon selon la méthode ISO 4833. Le résultat obtenu varie de 48 à $8,2 \cdot 10^4$ UFC/ml.

5.3.2 **Résultats obtenus par le laboratoire expert**

Tous les échantillons inoculés ont donné un résultat positif ; tous les résultats sont concordants entre la méthode de référence et la méthode alternative.

5.3.3 **Résultats obtenus par les laboratoires collaborateurs**

Onze laboratoires sur treize ont obtenu les résultats attendus.

Le laboratoire L a trouvé cinq échantillons non inoculés positifs par la méthode de référence (L4, L11, L13, L14 et L21), Le laboratoire L a probablement contaminé les tubes de RVS en utilisant une micropipette avec des cônes P200 pour ensemercer 0,1 ml d'EPT, alors que des cônes P1000 (plus longs) ont été utilisés pour ensemercer les volumes de 1 ml (MKTTn et OSRT). De plus, des fuites au niveau des sacs Stomacher ont été constatées au moment du broyage.

Le laboratoire M a trouvé trois échantillons non inoculés positifs à la fois par la méthode de référence et la méthode OSRT (M5, M14 et M23) et deux échantillons positifs uniquement par la méthode de référence (M4 et M14).

5.3.4 **Conclusion**

L'interprétation a été réalisée avec les résultats de onze laboratoires, les laboratoires L et M ayant eu des intercontaminations. Les résultats de ces deux laboratoires ont été exclus de l'interprétation.

5.4 **Calculs**

5.4.1 **Calcul des pourcentages de spécificité (%SP) et de sensibilité (% SE) pour les deux méthodes**

Le pourcentage de spécificité, pour le niveau L0 et pour chaque méthode, est calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$SP = \left[1 - \left(\frac{FP}{N-} \right) \times 100\% \right]$$

avec : N- = nombre total de tous les essais L0
FP = nombre de faux positifs

Le pourcentage de sensibilité, pour chaque niveau de contamination positif et pour chaque méthode, est calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$SE = \frac{TP}{N+} \times 100\%$$

avec : N+ = nombre total de tous les essais L1 ou L2

TP = nombre de vrais positifs

Les résultats sont reportés dans le tableau suivant :

Niveau	Méthode de référence		Méthode alternative	
	SP/SE %	LCL%	SP/SE %	LCL%
Lo(SP)	100	98	100	98
L1(SE)	100	98	100	98
L2(SE)	100	98	100	98
L1+L2(SE)	100	98	100	98

5.4.2 Calcul de l'exactitude relative (AC)

Les résultats pour tous niveaux confondus sont donnés ci-après :

Tableau 11 - Couples de résultats de la méthode alternative et de la méthode de référence dans le cadre de l'étude interlaboratoire

Méthode alternative	Méthode de référence		Total
	+	-	
+	PA = 176	PD = 0	176
-	ND = 0	NA = 88	88
Total	N+ = 176	N- = 88	N = 264

L'exactitude relative (AC), exprimée en pourcentage, est calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$AC = \frac{(PA + NA)}{N} \times 100\%$$

avec : N = nombre d'échantillons soumis à essai

PA = nombre d'accords positifs

NA = nombre d'accords négatifs

Les valeurs d'exactitude de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence ont été calculées pour chacun des niveaux et figurent dans les tableaux ci-après :

Niveau	AC %	LCL %
L0	100	98
L1	100	98
L2	100	98
L1 + L2	100	98
Total	100	98

5.4.3 Etude des résultats discordants

Aucun résultat discordant n'a été observé au cours de l'étude.

5.5 Interprétation

5.5.1 Comparaison des valeurs d'exactitude relative, de spécificité et de sensibilité

Les valeurs obtenues dans les deux parties de l'étude de validation (étude comparative des méthodes et étude interlaboratoire) sont reportées dans le tableau 13 :

Tableau 12 - Comparaison des valeurs obtenues lors de l'étude interlaboratoire avec celles obtenues dans le cadre de l'étude préliminaire, pour la méthode alternative

	Etude collaborative	Etude préliminaire
Exactitude relative (AC)	100	97,3
Sensibilité (SE)	100	98,6
Spécificité (SP)	100	96,2

5.5.2 Degré d'accord (DA)

Le degré d'accord est le pourcentage de chances de trouver le même résultat (c'est-à-dire tous les deux positifs ou tous les deux négatifs) pour deux prises d'essai identiques analysées dans le même laboratoire, dans des conditions de répétabilité (c'est-à-dire un seul opérateur utilisant le même appareillage et les mêmes réactifs dans l'intervalle de temps le plus court possible).

Le degré d'accord est ainsi l'équivalent de la répétabilité pour les méthodes quantitatives.

Les degrés d'accord pour la méthode de référence et la méthode alternative et pour chaque niveau sont reportés ci-après :

Niveau	Méthode de référence	Méthode alternative
L0	100 %	100 %
L1	100 %	100 %
L2	100 %	100 %

5.5.3 Concordanance

La concordanance est le pourcentage de chances de trouver le même résultat pour deux échantillons identiques analysés dans deux laboratoires différents. La concordanance est donc l'équivalent de la reproductibilité pour les méthodes quantitatives.

Les pourcentages de concordanance pour la méthode de référence et la méthode alternative, à chaque niveau, sont repris dans le tableau ci-après :

Niveau	Méthode de référence	Méthode alternative
L0	100 %	100 %
L1	100 %	100 %
L2	100 %	100 %

5.5.4 Odds Ratio (COR)

Il est calculé selon la formule suivante :

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

Les Odds ratio pour la méthode de référence et la méthode alternative sont donnés ci-après :

Niveau	Méthode de référence	Méthode alternative
L0	1,0	1,0
L1	1,0	1,0
L2	1,0	1,0

5.5.5 Conclusion

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

6 PRATICABILITE

La praticabilité de la méthode alternative a été évaluée d'après les treize critères définis dans les exigences relatives aux études préliminaires et collaboratives.

1. <i>Mode de conditionnement des éléments de la méthode</i>	<p>Les réactifs utilisés pour le <i>Salmonella</i> Rapid Test d'OXOID sont conditionnés dans trois <i>coffrets</i> distincts. Des formes de coffrets différentes permettent de les identifier plus aisément les uns des autres. On peut distinguer le coffret :</p> <ul style="list-style-type: none"> - OSRT : renfermant les flacons de culture conditionnés sous forme de 10 pochettes aluminium de 5 flacons, fermées hermétiquement; la fiche technique et 50 étiquettes; 50 disques de Novobiocine présentés avec un éjecteur de disque adapté pour une délivrance des disques dans les pots en toute sécurité ; 2 seringues, 2 aiguilles et la clef conditionnées dans une pochette plastique. -- SRTEM: renfermant 10 flacons identiques de milieu sélectif pour <i>Salmonella</i> Rapid Test d'OXOID. - <i>Salmonella</i> Latex Test (OSLT) : renfermant 3 flacons bien distincts les uns des autres et un support d'agglutination. Il permet la réalisation de 30 tests. <p>Ces différents critères sont indiqués dans la fiche technique.</p>
2. <i>Volume des réactifs</i>	Les volumes ou quantités des différents réactifs sont indiqués sur les emballages cartonnés et les différents flacons.
3. <i>Conditions de stockage des éléments et péremption des produits non ouverts</i>	<p>Le numéro de lot de fabrication, la date de péremption et la température de <i>stockage</i> des différents <i>réactifs</i> sont indiqués sur l'emballage cartonné et sur chacun des réactifs des coffrets. La température de stockage du coffret OSRT est de 15 à 25°C, celle des coffrets SRTEM prêt à l'emploi et du "<i>Salmonella</i> Latex Test" (OSLT) est de 2 à 8°C.</p> <p>Tous les réactifs sont stables jusqu'à la date d'expiration inscrite en clair sur chacun des coffrets à condition que les modes de conservation soient bien respectés.</p>
4. <i>Modalité d'utilisation après première utilisation</i>	<p>Des recommandations concernant :</p> <ul style="list-style-type: none"> - les délais d'utilisation des flacons de lecture restants, après ouverture du sachet, - le mode de conservation des différents réactifs, - la stabilité des <i>réactifs</i> dans le temps, <p>sont bien indiquées dans la fiche technique.</p> <p>Il en est de même pour l'entretien du matériel réutilisé plusieurs fois (seringues et aiguilles à bien décontaminer en début de chaque série de manipulations).</p>

5. <i>Équipements ou locaux spécifiques nécessaires</i>	Les équipements nécessaires (oèses, étuves, vortex, pipettes...) et les locaux nécessaires à la réalisation du test "OSRT" ne sont pas spécifiques à la méthode alternative et correspondent à ceux classiquement rencontrés dans un laboratoire d'analyses microbiologiques.
6. <i>Réactifs prêts à l'emploi à reconstituer</i>	Tous les réactifs sont prêts à l'emploi. Seul le test en lui-même (récipient pour culture OSRT) nécessite une préparation tout en respectant les techniques et précautions d'usage en bactériologie. Le mode de préparation est clairement décrit et n'exige pas de compétences particulières. Des précautions d'emploi ou d'utilisation des différents réactifs sont bien expliquées ou fournies dans la fiche technique.
7. <i>Durée de formation de l'opérateur non initié à la méthode</i>	Pour un opérateur formé aux techniques classiques de microbiologie, la mise en application du test OSRT nécessite au maximum une demi-journée.

8. *Temps réel de manipulation et flexibilité par rapport au nombre d'échantillons à analyser (temps en minutes)*

Étapes	1 échantillon		10 échantillons		30 échantillons	
	Méthode de référence	Méthode alternative	Méthode de référence	Méthode alternative	Méthode de référence	Méthode alternative
Préparation, pesée, dilution et broyage	5	5	25	25	75	75
Repiquage sur bouillons RVS et MKTTn	3		17		50	
Réalisation du test (préparation et inoculation)		5		18		60
Isolement des bouillons RVS et MKTTn	5		40		60	
Lecture des géloses	2		20		60	
Lecture du test		1		5		10
Total (échantillons négatifs)	15	11	102	48	245	145
Total / échantillon négatif	15	11	10,2	4,8	8,2	4,8

Ces temps correspondent à des séries d'échantillons négatifs pour lesquels aucune confirmation n'est nécessaire. Dans le cas de séries d'échantillons tous positifs, il faut rajouter le temps nécessaire aux confirmations :

Étapes	1 échantillon		10 échantillons		30 échantillons	
	Méthode de référence	Méthode alternative	Méthode de référence	Méthode alternative	Méthode de référence	Méthode alternative
Confirmation du kit OSRT par le test latex		2		7		20
Confirmation du kit OSRT par tests classiques		10		58		173
Tests de confirmation	10		60		180	
Total (échantillons positifs)	25	Latex : 13 Classique : 21	162	Latex : 55 Classique : 106	538	Latex : 165 Classique : 318
Total / échantillon positif	25	Latex : 13 Isolement : 21	16,2	Latex : 5,5 Isolement : 10,6	17,9	Latex : 5,5 Isolement : 10,6

9. <i>Délai d'obtention des résultats</i>	En considérant l'étape de pré-enrichissement en EPT à J0				
	Echantillons négatifs	Etapes	Méthode de référence	Méthode alternative	
				Confirmation latex	Confirmation par isolement sur gélose sélective
		Réalisation du préenrichissement	J0	J0	J0
		Inoculation des bouillons sélectifs (RVS, MKTTn, OSRT)	J1	J1	J1
		Lecture du kit OSRT		J2	J2
		Isolement sur géloses sélectives	J2		
		Lecture des géloses sélectives	J3		
		Obtention du résultat négatif	J3	J2	J2
	Echantillons positifs	Etapes	Méthode de référence	Méthode alternative	
			Confirmation latex	Confirmation par isolement sur gélose sélective	
Réalisation du préenrichissement		J0	J0	J0	
Inoculation des bouillons sélectifs (RVS, MKTTn, OSRT)		J1	J1	J1	
Lecture du kit OSRT (résultat présomptif)			J2	J2	
Test latex			J2		
Isolement sur géloses sélectives		J2		J2	
Lecture des géloses sélectives		J3		J3	
Isolement sur GN					
Tests de confirmation		J4		J4	
Obtention du résultat positif	J5	J2	J5		

10. <i>Type de qualification de l'opérateur</i>	Le niveau de qualification requis pour l'opérateur est identique à celui requis pour réaliser la méthode de référence.
11. <i>Etapes communes avec la méthode de référence</i>	Seules les phases de pré-enrichissement (modalités de préparation, dilution et d'incubation des échantillons) et de confirmation (tests confirmation identiques à partir de colonies typiques sur géloses sélectives) sont communes à la méthode de référence et à la méthode alternative.
12. <i>Traçabilité des résultats</i>	Il n'existe pas de traçabilité spécifique. Les laboratoires peuvent utiliser leur propre procédure de traçabilité comme pour la méthode de référence.
13. <i>Maintenance par le laboratoire</i>	Il n'y a aucune maintenance spécifique, mise à par les procédures de vérification des lots et de la date de péremption, classiquement mises en œuvre au laboratoire.

7 CONCLUSION

Les **conclusions de l'étude comparative des méthodes** sont les suivantes :

- ❑ **Quel que soit le test de confirmation, test latex ou isolement sur gélose sélective, la méthode OSRT (*Salmonella* Rapid Test d'Oxoid) montre une exactitude relative, un niveau de détection relatif, une inclusivité et une exclusivité satisfaisants.**
- ❑ Les performances d'exactitude, spécificité et sensibilité relatives sont équivalentes lors d'une conservation du bouillon d'enrichissement pendant 72 h à 4°C.
- ❑ La méthode permet de diminuer par un coefficient de 1,5 à 3 le temps de manipulation, selon qu'il s'agisse de séries comprenant des échantillons négatifs et/ou positifs, selon le test de confirmation choisi. Elle montre un gain de temps à la confirmation des résultats positifs.

Les **conclusions de l'étude interlaboratoire** sont les suivantes :

- ❑ La variabilité de la méthode alternative (degré d'accord, concordance, odds ratio) est identique à celle de la méthode de référence.

Annexe 1 - Méthode alternative

25 g + 225 ml Eau Peptonée Tamponnée



37°C ±1°C, 16 - 20 h

1 ml dans kit OSRT



41°C ±1°C, 24 h

Test positif



Confirmation :

- Test Latex *Salmonella*

ou

- Isolement sur gélose sélective et tests classiques de confirmation
biochimiques et sérologiques
(dans le cadre de la validation, les deux tests sont réalisés)

Salmonella Rapid Test – Mode d'emploi

Introduction

Le Salmonella Rapid Test d'Oxoid permet le diagnostic de présomption de *Salmonella* mobile dans les matières premières alimentaires, les produits finis et les prélèvements effectués dans l'environnement de la fabrication.

Principe

Le pré-enrichissement d'un échantillon homogénéisé dans un milieu adapté est suivi par l'inoculation dans un récipient pour la culture, d'un milieu spécial pour *Salmonella* et de deux tubes. Chaque tube contient un milieu sélectif et un milieu indicateur supérieur, séparés par un filtre poreux. Les *Salmonella* migrent activement à travers le milieu sélectif inférieur vers le milieu indicateur supérieur, où leur présence entraîne un changement de couleur. Les tubes présentant une réaction positive doivent être testés ensuite avec le Salmonella Latex Test, qui met en évidence la présence d'antigènes somatiques et flagellaires de *Salmonella*, par une réaction d'agglutination de particules de latex ou au moyen de milieux de culture traditionnels.

Composition du coffret

FT0201 – 50 récipients pour culture
Chaque récipient contient deux tubes :

Tube A (bouchon bleu) : contient un milieu Rappaport-vassiliadis modifié comme milieu sélectif, et comme milieu indicateur le milieu rouge neutre modifié Lysine Fer Cystéine.

Tube B (bouchon rouge) : contient comme milieu sélectif le milieu modifié au Désoxycholate Fer Lysine et comme milieu indicateur le milieu au Vert Brillant modifié.

50 disques de Novobiocine (FT0207)
Chaque disque contient 1,8 mg de Novobiocine

2 seringues et des aiguilles
1 clef (code FT0202)
50 étiquettes
1 fiche technique

Matériel nécessaire mais non fourni :

Milieu de pré-enrichissement
Eau distillée stérile
Milieu spécial pour Salmonella SRTEM (CM0857)

Pipettes
Salmonella Latex Test (code FT0203)
Vortex
Incubateur (35°C ou 37°C ou 41°C)

Préparation du matériel

Les échantillons à tester sont pré-enrichis dans un milieu adapté. Exemple : par homogénéisation d'une dilution au 1/10 de l'échantillon dans de l'eau peptonée tamponnée (CM0509) ou un autre milieu recommandé.^{1,2,3} Incuber la culture de pré-enrichissement à 37°C pendant 16 à 20 h.

Méthode

Préparation du récipient pour culture

Durant cette préparation, utiliser les techniques et les précautions d'usage en bactériologie.

Remarque concernant la préparation

Préparer chaque récipient jusqu'à l'étape 6.1.6 avant de passer au suivant.

L'homogénéité des milieux est améliorée en agitant le récipient au vortex avant d'enlever le couvercle et de réhydrater les milieux (étapes 1 et 2)

- Dévisser le bouchon du récipient pour culture.
- Ajouter de l'eau distillée stérile jusqu'à la ligne inférieure (ligne n°1) marquée sur le côté du récipient (environ 27 ml). Vérifier que la base des deux tubes A et B soit bien sous le niveau d'eau.
- Fixer l'aiguille sur la seringue sans enlever son emballage protecteur. Enlever la protection et introduire avec précaution l'aiguille dans le trou situé au centre du bouchon bleu. S'assurer que l'aiguille est visible sous le bouchon. Tirer délicatement sur le corps de la seringue jusqu'à ce que le liquide atteigne dans le tube la marque n°3 (inscrite sur le récipient). La vitesse doit être choisie de façon à ce que cette opération prenne environ 5 secondes. Enlever la seringue et l'aiguille et remettre l'embout de protection. Vérifier que le tube n'ait pas quitté sa position dans le récipient, et que le bouchon du tube ne soit pas desserré.
- Répéter immédiatement l'étape n°3 (ci-dessus) pour le tube B (bouchon rouge).
- Remettre le bouchon du récipient. Appuyer le côté du récipient contenant les deux tubes sur un vortex en le maintenant 5 secondes. Il est important que les liquides dans les tubes soient fortement agités. Après vortexage, laisser reposer 5 minutes. Le dispositif SRT peut être gardé ainsi pendant 4 heures avant l'étape 6.
- Enlever délicatement le bouchon du récipient, ajouter le milieu spécial pour Salmonella Rapid Test (SRTEM) dans le récipient, jusqu'à ce que le niveau atteigne la ligne n°2 (inscrite sur la paroi). Préparer le milieu selon les directives inscrites sur le flacon SRTEM).

REMARQUE : après autoclavage, la couleur du milieu peut varier (du bleu-vert au jaune) sans que la qualité du produit en soit altérée.
- Ajouter aseptiquement un disque de Novobiocine à la culture.

ATTENTION : veiller à ce que le récipient soit maintenu en position verticale pendant toute la durée du test.
- Utiliser la clef fournie pour enlever les bouchons rouges et bleus des tubes. Eviter de toucher avec les mains les tubes eux-mêmes, comme la

paroi intérieure du récipient. Jeter les bouchons bleus et rouges.

9. Replacer le bouchon du récipient. Celui-ci est maintenant prêt à être utilisé.

Mode d'utilisation du récipient pour culture :

- 1) Après incubation, agiter la culture de pré-enrichissement.
- 2) Identifier le prélèvement sur l'une des étiquettes fournies et apposer celle-ci sur le récipient pour culture.
- 3) Enlever le bouchon, ajouter 1 ml de culture de pré-enrichissement dans le récipient pour culture préparé.
- 4) Remettre le bouchon.
- 5) Placer le récipient à l'étuve contrôlée à 41°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) et incuber 24 h. à 0,5 h., en prenant soin de la laisser en position verticale.

Lecture et interprétation

1. Après 24 h d'incubation, retirer le flacon de l'étuve et observer à la lumière l'éventuel changement de coloration du milieu supérieur indicateur dans les tubes. Observer les tubes à travers les parois du récipient sans les retirer.

Un noircissement peut avoir lieu dans les parties inférieures des tubes. Les réactions colorées doivent être lues uniquement au niveau des milieux indicateurs supérieurs.

2. La présence éventuelle de *Salmonella* se caractérise par un changement de couleur du milieu indicateur supérieur de l'un des tubes ou des deux.

POSITIF :

Tube A – TOUS LES DEGRES DE COLORATION NOIRE

Tube B – TOUS LES DEGRES DE COLORATION ROUGE OU NOIRE

NEGATIF :

Tube A – ABSENCE DE COLORATION NOIRE

Tube B – ABSENCE DE COLORATION ROUGE OU NOIRE

Tube A :

Variation de coloration du milieu indicateur supérieur :

- 1) Tube prêt à l'emploi avant incubation.
- 2) Résultat négatif – pas de noircissement
- 3) Résultat positif – faible noircissement
- 4) Résultat positif – fort noircissement

Tube B

Variations de coloration du milieu indicateur supérieur :

- 1) Tube prêt à l'emploi avant incubation
- 2) Résultat négatif – faible variation
- 3) Résultat négatif – milieu supérieur vert jaune
- 4) Résultat négatif – milieu supérieur vert jaune

- 5) Résultat positif – rougissement seulement. Le rougissement peut être limité à une bande étroite au niveau du ménisque.
- 6) Résultat positif – noircissement et faible rougissement.
- 7) Résultat positif – milieu rouge et noir.
- 8) Résultat positif – milieu rouge et noir.

LES COULEURS INDIQUEES DANS LA GALERIE DE LECTURE SONT DONNEES A TITRE INDICATIF ; DES REACTIONS PLUS FAIBLES PEUVENT ETRE OBSERVEES. UN TEST D'ORIENTATION RAPIDE PAR LE REACTIF LATEX SERA EFFECTUEE.

3. Les tubes présentant une réaction positive doivent être testés ensuite avec le Salmonella Latex Test (code FT203). Les résultats positifs indiquent la **présence** de *Salmonella*. Les résultats **peuvent de même** être confirmés au moyen de milieux de culture traditionnels et des techniques sérologiques. Pour cela, réaliser une subculture en milieu d'isolement sélectif, à partir de la couche indicatrice contenue dans le tube ayant donné le résultat positif avec le test au latex.

Limites

La méthode de détection utilisée dans ce test ne permet pas la mise en évidence des *Salmonella* non mobiles (incidence inférieure à 0,1 %⁴). La pousse des *Salmonella* peut être inhibée à une température supérieure ou égale à 43°C.

D'autre part, selon l'étude AFNOR effectuée en décembre 2003, les souches de *Salmonella* paratyphi B et C ont donné un résultat positif avec le test OSRT. Par contre, les souches de *Salmonella* typhi et paratyphi A ne sont pas détectées par le test OSRT.

Ce système est à utiliser avec le test latex Oxoid (FT203). Les autres tests de confirmation sérologique n'ont pas été validés.

Précautions

Ne pas pipeter avec la bouche.

Durant toute la manipulation, utiliser les techniques et les précautions d'usage en bactériologie.

Autoclaver tous les récipients pour culture avant de les jeter.

Il est recommandé de décontaminer la seringue et l'aiguille au début de chaque série de manipulations par aspirations et rejets successifs d'éthanol à 70 %. Expulser tout résidu d'éthanol dans la seringue et l'aiguille avant utilisation. Conserver la seringue et l'aiguille dans un emballage fermé après utilisation.

Conservation

Conserver le coffret à 18-25°C dans un endroit sec.

Bien refermer le sachet d'emballage contenant le dessiccateur après avoir pris le nombre de récipients pour culture nécessaires à la manipulation du jour. Tous les composants du coffret doivent être utilisés avant la date d'expiration indiquée.

Performances

Le Salmonella Rapid Test d'Oxoid a été testé vis-à-vis des techniques de cultures classiques dans différents aliments. Cette étude a porté sur plus de 800 prélèvements, évalués dans 9 laboratoires alimentaires différents en Europe et aux U.S.A.

Aliments	Nombre d'échantillons		Total échantillons positifs *		Nombre de résultats positifs			
					Oxoid		Classiques	
Volailles	116	(10)**	48	(8)	47	(7)	43	(8)
Viandes crues	236	(45)	87	(34)	87	(34)	76	(30)
Viandes cuites	23	(6)	6	(6)	6	(6)	6	(6)
Abats	10		6		5		3	
Légumes	25	(1)	1	(1)	1	(1)	1	(1)
Pâtisseries	35	(24)	18	(18)	18	(18)	18	(18)
Herbes et épices	38	(15)	15	(15)	15	(15)	15	(15)
Petit lait	9		1		1		1	
Lait en poudre	28	(10)	10	(10)	10	(10)	10	(10)
Glaces	19	(6)	6	(6)	6	(6)	6	(6)
Œufs/laits	21		2		2		2	
Ecouvillons	37		2		1		2	
Nourriture pour animaux	100		8		7		5	
Autres	122		13		10		13	
TOTAL	820	(117)	223	(98)	216	(97)	201	(94)

Sensibilité : . méthode classique 201/223 = 90,1 %
 . test Oxoid Ltd 216/223 = 96,8 %

* Echantillons positifs par la méthode classique, le test Oxoid avec confirmation ou les deux.

** Les nombres entre parenthèses correspondent aux échantillons artificiellement contaminés.

Remarques importantes**1. Principe général du test****a) Pré-enrichissement**

16 à 20 heures à 37°C.

Permet une récupération de tous les germes stressés, tout en conservant un rapport *Salmonella*/germes associés acceptable pour le test.

b) Culture pour le récipient

24 heures ± 0,5 h. à 41°C ± 1°C.

Cette température doit être respectée impérativement.

Une température supérieure risque de diminuer la mobilité des salmonelles, une température inférieure favorisant la pousse des germes associés.

2. Préparation du récipient

- L'homogénéité des milieux est améliorée en agitant le récipient au vortex avant la reconstitution.
- Dès la reconstitution des milieux par l'eau distillée stérile, agiter au vortex ; ainsi, l'agent gélifiant peut agir rapidement.

3. Lecture

- Le niveau des milieux dans les tubes peut varier durant l'incubation sans que ceci n'ait de conséquence sur le résultat.
- Lecture :

Tube A : recherche d'un noircissement du milieu.

Tube B : dans le milieu indicateur supérieur, on va rechercher un rougissement du milieu : ce rougissement peut être vu sur tout ou partie du milieu.

La partie supérieure du milieu, au niveau du ménisque, plus liquide, est souvent la 1^{ère} zone à changer de couleur. Un noircissement du milieu, par la diffusion de l'H₂S produit au niveau inférieur, peut aussi être observé.

Toute réaction positive ou douteuse sur le tube A et/ou B nécessite la réalisation du test au latex rapide SLT.

Pour cela :

Prélever une oese à la surface du milieu indicateur positif, dans la partie la plus liquide. Eventuellement, incliner le récipient et prélever une oese par capillarité le long de la paroi du tube positif. Réaliser ensuite l'agglutination avec les particules de latex sur le support fourni dans le coffret.

4. Isolement de la souche

Une confirmation sur milieux de culture traditionnels est effectuée à partir de ce milieu indicateur positif.

Réaliser une dilution en eau peptonée (une oese dans 5 ml) du milieu positif et ensemercer immédiatement cette dilution sur un milieu d'isolement sélectif type Hektoen, XLD, gélose au vert brillant modifié.

Dans le cadre de la **marque validation AFNOR**, tous les résultats positifs sont confirmés de l'une des manières suivantes :

a) Cas 1

Une confirmation par les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (incluant l'étape de purification) sera effectuée à partir du milieu indicateur positif. Il convient de réaliser une dilution en eau peptonée tamponnée (une oese dans 5 ml) du milieu indicateur positif et d'ensemencer immédiatement cette dilution sur un milieu d'isolement sélectif (type OSCM II, XLD, Hektoen, gélose au Vert brillant modifiée).

b) Cas 2

Un test au latex OSLT (FT0203A) sera effectué à partir du tube positif. L'agglutination du latex détermine la présence de *Salmonella* spp.

c) Cas 3

Tout autre méthode validée AFNOR pourra de même être employée pour la confirmation du test en suivant la fiche technique du fabricant.

Le protocole validé de la seconde méthode devra être respecté dans son ensemble, c'est-à-dire que toutes les étapes antérieures à l'étape intermédiaire de laquelle on repart pour la confirmation doivent être communes aux deux méthodes (exemple : enrichissement commun avec un même milieu). Les deux méthodes validées (l'une utilisée en détection et l'autre en confirmation) doivent donc avoir un tronçon commun.

En cas de résultat discordant (positif par la méthode alternative non confirmé par la méthode de référence ou par une autre méthode validée AFNOR), le laboratoire devra mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

La validation du coffret OSRT a été reconduite par l'AFNOR, selon le référentiel ISO 16140, le , comme méthode rapide pour l'alimentation humaine, animale et les échantillons environnementaux par rapport à la norme de référence ISO 6579 en vigueur. L'attestation UNI 03/01-05/91 (reconduite les 8/09/95, 7/9/99 et 11/12/03) est valide pendant 4 ans jusqu'au et peut être obtenue auprès de nos services.

Références

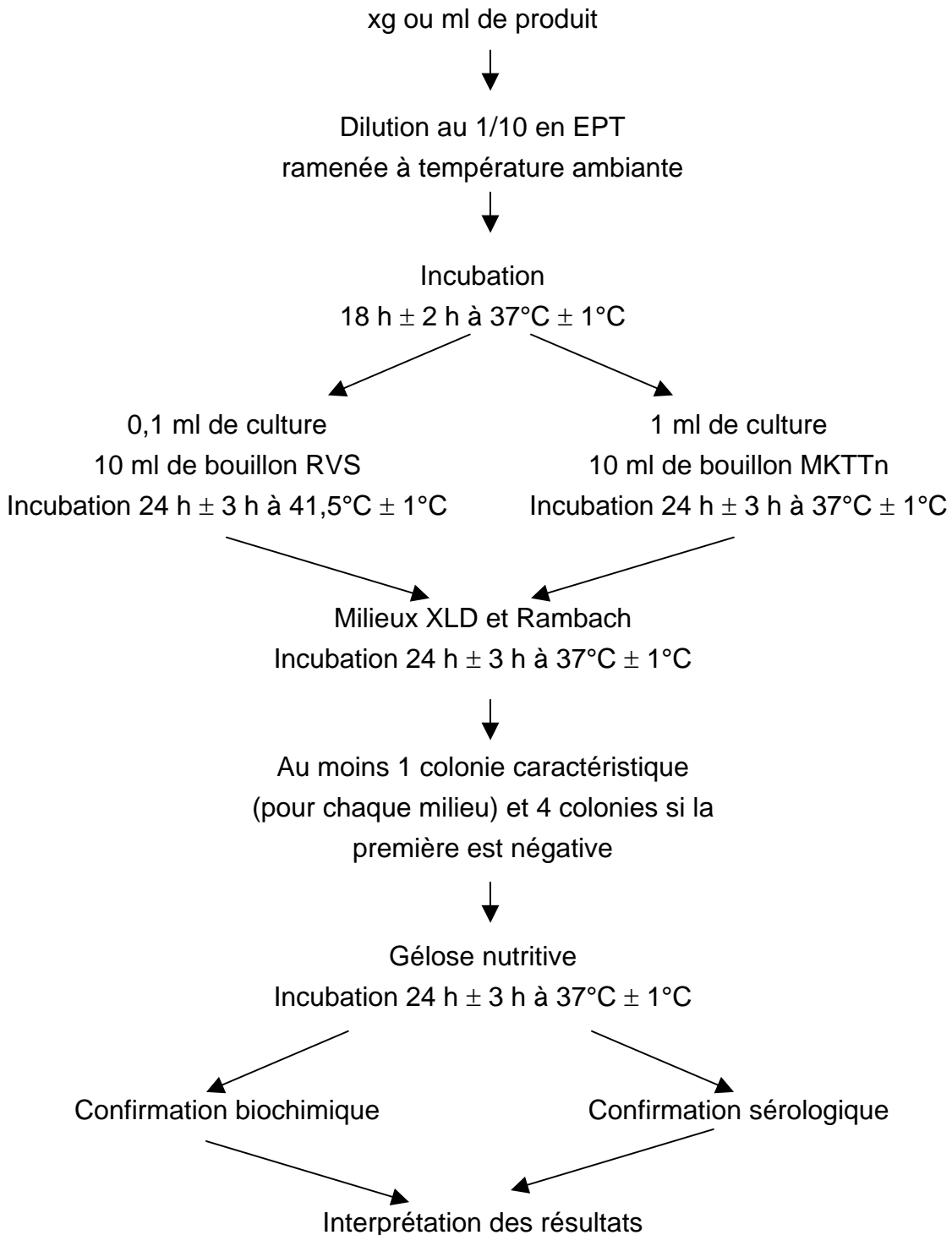
- Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 2nd Ed. (1984), American Public Health Association Inc., Ed., M. L. Speck.
- F.D.A. Bacteriological Analytical Manual, 6th Ed. (1984). Published by Association Official Analytical Chemists.
- Microorganisms in Food 1, (1978), 2nd Ed., International Commission on Microbiological Specifications for Foods. University of Toronto Press.
- Personal Communication from Dr. A.C. Baird-Parker.
- Rapid Detection of Salmonellae in Foods – A convenient two day Procedure. Letters in Applied Microbiol., 1989, 8, 139-142. R. Holbrook, J.M. Anderson, A.C. Baird-Parker, L.M. Dodds, D. Sawhney, S.H. Stuchbury and D. Swaine.
- Comparative Evaluation of the Oxoid Salmonella Rapid Test with there other Rapid Samonella Methods. Letters in Applied Microbiol., 1989, 9, 161-164. R. Holbrook, J.M. Anderson, A.C. Baird-Parker and S.H. Stuchbury.

Fabriqué par Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire. G.B.

Distribué en France par Oxoid – BP 13 – 69571 Dardilly Cedex
Tél 04 72 52 33 70 - Fax 04 78 66 03 76

Annexe 2 - Méthode de référence

NF EN ISO 6579 : 2002 : Microbiologie des aliments
Méthode horizontale pour la recherche de *Salmonella*



Annexe 3 - Résultats bruts de l'inclusivité et de l'exclusivité

SOUCHES NEGATIVES								
Souche	Référence	Origine	Taux d'inoculation ufc/ml	OSRT				
				Tube A	Tube B	Latex	Isolement OSCMII	
1.	<i>Citrobacter Diversus</i>	adria 140	Lait cru	1,3.10 ⁵	-	-	/	/
2.	<i>Citrobacter Koseri</i>	adria 71	Légumes surgelés	1,1.10 ⁵	-	-	/	/
3.	<i>Citrobacter Freundii</i>	adria 23	Saucisse de Toulouse	5,6.10 ⁴	-	-	/	/
4.	<i>Citrobacter Freundii</i>	59		1,0.10 ⁵	-	-	/	/
5.	<i>Citrobacter Freundii</i>	adria 175	VSM de canard	1,2.10 ⁵	-	-	/	/
6.	<i>Escherichia Coli</i>	adria 2B	Saucisse	7,4.10 ⁴	-	-	/	/
7.	<i>Escherichia Coli</i>	adria 19	Carottes râpées	7,0.10 ⁴	-	-	/	/
8.	<i>Escherichia Coli</i>	adria 6	Saucisse	9,4.10 ⁴	-	-	/	/
9.	<i>Escherichia Vulneris</i>	adria 127	Lait cru	1,3.10 ⁵	-	-	/	/
10.	<i>Escherichia Hermanii</i>	Ad 461	Crème anglaise	9,3.10 ⁴	-	-	/	/
11.	<i>Enterobacter Agglomerans</i>	adria 11	Fromage	9,4.10 ⁴	-	-	/	/
12.	<i>Enterobacter Amnigenus</i>	A00C068	Coquelet	1,1.10 ⁵	-	-	/	/
13.	<i>Enterobacter Cloacae</i>	adria 10	Lait cru	7,0.10 ⁴	-	-	/	/
14.	<i>Enterobacter Cloacae</i>	adria 128	Steak haché	8,7.10 ⁴	-	-	/	/
15.	<i>Enterobacter Kobei</i>	Ad 342	Jambon	1,0.10 ⁵	-	-	/	/
16.	<i>Enterobacter Sakazakii</i>	adria 95	Fromage blanc	8,3.10 ⁴	-	-	/	/
17.	<i>Enterobacter Sakazakii</i>	adria D7	Volaille	1,3.10 ⁵	-	-	/	/
18.	<i>Hafnia Alvei</i>	adria 167	Saucisse	1,1.10 ⁵	-	-	/	/
19.	<i>Hafnia Alvei</i>	adria 168	VSM de canard	1,3.10 ⁵	-	-	/	/
20.	<i>Klebsiella Oxytoca</i>	57		1,0.10 ⁵	-	-	/	/
21.	<i>Klebsiella Oxytoca</i>	42		1,2.10 ⁵	-	-	/	/
22.	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	28		1,1.10 ⁵	-	-	/	/
23.	<i>Proteus Mirabilis</i>	adria 54	VSM de volaille	1,5.10 ⁵	-	-	/	/
24.	<i>Proteus Mirabilis</i>	55		1,2.10 ⁵	-	-	/	/
25.	<i>Proteus Vulgaris</i>	56		4,4.10 ⁴	-	-	/	/
26.	<i>Rhanella Aquatilis</i>	Ad 69	Coquillages	<20	-	-	/	/
27.	<i>Serratia Liquefaciens</i>	5	Ovoproduit	1,3.10 ⁵	-	-	/	/
28.	<i>Serratia Proteomaculans</i>	A00C056	Jambon	1,5.10 ⁵	-	-	/	/
29.	<i>Shigella Sonnei</i>	CIP 8249T (ATCC 29930)		1,3.10 ⁵	-	-	/	/
30.	<i>Yersinia Enterocolitica</i>	adria 32	Lardons	1,1.10 ⁵	-	-	/	/

SOUCHES POSITIVES								
Souche	Référence	Origine	Taux d'inoculation ufc/225ml	OSRT				
				Tube A	Tube B	Latex	Isolement OSCMII	
1.	<i>Salmonella Agona</i>	A00V038	Alimentation animale	54	+	+	+	Colonies violacées
2.	<i>Salmonella Anatum</i>	A00E007	Poussières laiterie	44	+	+	+	Colonies violacées
3.	<i>Salmonella Arizonae</i>	Ad 450	Lait de brebis	33	+	+	+	Colonies violacées
4.	<i>Salmonella Arizonae</i>	Ad 478	Palourdes	73	+	+	+	Colonies violacées
5.	<i>Salmonella Binza</i>	adria 27	Elevage	48	+	+	+	Colonies crème avec centre violacé
6.	<i>Salmonella Bovis morbificans</i>	adria 132	Poitrine fumée crue	44	+	+	+	Colonies violacées
7.	<i>Salmonella Bovis morbificans</i>	adria 6629	Chipolatas	34	+	+	+	Colonies violacées
8.	<i>Salmonella Brandenburg</i>	adria 499	Saucisse de Toulouse	51	+	+	+	Colonies violacées
9.	<i>Salmonella Branderup</i>	adria 111	VSM de porc	41	+	+	+	Colonies violacées
10.	<i>Salmonella Brando</i>	adria 569	Chair à saucisse	43	+	+	+	Colonies violacées
11.	<i>Salmonella Bredeney</i>	adria 141	Crépinette	56	+	+	+	Colonies violacées
12.	<i>Salmonella Bredeney</i>	adria 464	Pâté de tête	59	+	+	+	Colonies violacées
13.	<i>Salmonella Cremieu</i>	Ad 230	Lièvre	49	+	+	+	Colonies violacées
14.	<i>Salmonella Derby</i>	adria 374	Chipolatas	36	+	+	+	Colonies violacées
15.	<i>Salmonella Diarizoane</i>	Ad 595	Fromage	51	+	+	+	Colonies violacées
16.	<i>Salmonella Dublin</i>	Ad 528	Pâte à galettes	57	+	+	+	Colonies violacées
17.	<i>Salmonella Dublin</i>	Ad 529	Hampe de boeuf	37	+	+	+	Colonies crème
18.	<i>Salmonella Dublin</i>	Ad 530	Steak haché	34	+	+	+	Colonies crème
19.	<i>Salmonella Dublin</i>	Ad 531	Fromage au lait cru	50	+	+	+	Colonies crème
20.	<i>Salmonella Dublin</i>	adria 40	Produit alimentaire	37	+	+	+	Colonies crème
21.	<i>Salmonella Duisberg</i>	adria 42	Elevage	37	+	+	+	Colonies violacées
22.	<i>Salmonella Enteritidis</i>	adria 2532	Jambon cuit	44	+	+	+	Colonies violacées
23.	<i>Salmonella Enteritidis</i>	adria 657	Coule d'œuf	55	+	+	+	Colonies violacées
24.	<i>Salmonella Hadar</i>	35	Volaille	57	+	+	+	Colonies violacées
25.	<i>Salmonella Hadar</i>	adria 24871	Blanc de poulet	35	+	+	+	Colonies violacées
26.	<i>Salmonella Heidelberg</i>	adria 24876	Blanc de poulet	7	+	+	+	Colonies violacées
27.	<i>Salmonella Heidelberg</i>	adria 285	Farce de tomate	61	+	+	+	Colonies violacées
28.	<i>Salmonella Indiana</i>	adria 2	Farine de poisson	20	+	+	+	Colonies violacées
29.	<i>Salmonella Infantis</i>	adria 14	Coule d'œuf	19	+	+	+	Colonies violacées
30.	<i>Salmonella Infantis</i>	adria 401B	Lait cru	33	+	+	+	Colonies violacées
31.	<i>Salmonella Kottbus</i>	1	Volaille	50	+	+	+	Colonies violacées
32.	<i>Salmonella Lilvingstone</i>	F104	Alimentation animale	22	+	+	+	Colonies violacées
33.	<i>Salmonella London</i>	adria 326	Epaule cuite	23	+	+	+	Colonies violacées
34.	<i>Salmonella Manhattan</i>	adria 900	Poussière de laiterie	13	+	+	+	Colonies violacées
35.	<i>Salmonella Mbandaka</i>	adria 81	Coule d'œuf	7	+	+	+	Colonies violacées
36.	<i>Salmonella Newport</i>	adria 540	Saucisse de Toulouse	19	+	+	+	Colonies violacées
37.	<i>Salmonella Newport</i>	adria 586	Carcasse de bœuf	20	+	+	+	Colonies violacées
38.	<i>Salmonella Panama</i>	adria 8	Steak haché	22	+	+	+	Colonies violacées
39.	<i>Salmonella Panama</i>	adria 882	Chipolatas aux herbes	9	+	+	+	Colonies violacées
40.	<i>Salmonella Paratyphi A</i>	ATCC 9150		17	-	-	/	/
41.	<i>Salmonella Paratyphi A</i>	ATCC 11511		47	-	-	/	/

SOUCHES POSITIVES								
Souche	Référence	Origine	Taux d'inoculation ufc/225ml	OSRT				
				Tube A	Tube B	Latex	Isolement OSCMII	
42.	<i>Salmonella Paratyphi A</i>	CIP 5541	-	-	-	/	/	
43.	<i>Salmonella Paratyphi B</i>	Ad 301	Humaine	49	+	+	+	Colonies violacées
44.	<i>Salmonella Paratyphi C</i>	ATCC 13428		63	-	+	+	Colonies violacées
45.	<i>Salmonella Regent</i>	adria 328	Canard	37	+	+	+	Colonies violacées
46.	<i>Salmonella Saintpaul</i>	631	Volaille	58	+/-	+	+	Colonies violacées
47.	<i>Salmonella Seftenberg</i>	1	Produit alimentaire	42	+	+	+	Colonies violacées
48.	<i>Salmonella Tennessee</i>	A00E006	Poussières laiterie	58	+	+	+	Colonies violacées
49.	<i>Salmonella Thompson</i>	AER 301	Volaille	41	+	+	+	Colonies violacées
50.	<i>Salmonella Typhi</i>	Ad 302	Humaine	49	+	+	+	Colonies violacées
51.	<i>Salmonella Typhimurium</i>	adria 206	Coule d'œuf pasteurisée	63	+	+	+	Colonies violacées
52.	<i>Salmonella Typhimurium</i>	adria 305	Paella	34	+	+	+	Colonies violacées
53.	<i>Salmonella Typhimurium</i>	adria 528	Saumure	61	+	+	+	Colonies violacées
54.	<i>Salmonella Virchow</i>	F276	Curry	55	+	+	+	Colonies violacées
55.	<i>Salmonella Worthington</i>	adria 3506	Terrine de pâté	43	+	+	+	Colonies violacées