

ETUDE DE LA VALIDATION AFNOR CERTIFICATION
DU TEST RIDASCREEN SALMONELLA
POUR LA DETECTION DES SALMONELLES
SELON LA NORME NF EN ISO 16140

RAPPORT DE SYNTHÈSE

Ce rapport d'analyse ne concerne que les objets soumis aux analyses. Sa reproduction n'est autorisée que sous forme de fac-similé photographique intégral. Il comporte 21 pages (hors annexes).

Seuls certains essais rapportés dans ce document sont couverts par l'accréditation de la Section Laboratoire du COFRAC.

Ils sont identifiés par le symbole (*)

Essais réalisés à l'ISHA : 25, avenue de la République 91300 Massy

Fabricant : **R-BIOPHARM**

R-Biopharm AG
Landwehrstr. 54
D-64293 Darmstadt

Laboratoire expert : **I. S. H. A.**

25, avenue de la République
91300 MASSY

En vue de la validation AFNOR Certification selon la norme
NF EN ISO 16140 du test RIDASCREEN *Salmonella* pour la détection
des salmonelles avec confirmation.

1	<u>INTRODUCTION</u>	<u>4</u>
1.1	Référentiel de validation	4
1.2	Méthode alternative	4
1.3	Domaine d'application	6
1.4	Méthode de référence.....	6
2	<u>RESULTATS DE L'ETUDE PRELIMINAIRE</u>	<u>6</u>
2.1	Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative	6
2.1.1	Nombre et nature des échantillons.....	6
2.1.2	Contamination artificielle des échantillons	7
2.1.3	Calcul de l'exactitude relative, de la spécificité relative et de la sensibilité relative	8
2.1.4	Analyse des résultats discordants.....	9
2.1.5	Lecture visuelle du test de la méthode alternative	10
2.2	Niveau de détection relatif de la méthode alternative et la méthode de référence	10
2.2.1	Matrices utilisées	10
2.2.2	Protocole de contamination	10
2.2.3	Résultats des essais	11
2.2.4	Conclusion	11
2.3	Sélectivité	11
2.3.1	Protocoles d'essai	11
2.3.2	Résultats des essais	11
2.4	Praticabilité.....	12
3	<u>ETUDE COLLABORATIVE</u>	<u>14</u>
3.1	Mise en œuvre de l'étude collaborative	14
3.1.1	Laboratoires collaborateurs	14
3.1.2	Vérification de l'absence de <i>Salmonella</i> spp dans la matrice utilisée.....	14
3.1.3	Stabilité de la souche dans la matrice lait pasteurisé	14
3.1.4	Préparation et inoculation des échantillons.....	14
3.1.5	Etiquetage des échantillons.....	15
3.1.6	Expédition des échantillons	15
3.1.7	Réception et analyse des échantillons par les laboratoires collaborateurs	15
3.2	Résultats	15
3.2.1	Température et état des échantillons à réception	15
3.2.2	Dénombrements de la flore totale	16
3.2.3	Résultats du laboratoire expert.....	16
3.2.4	Résultats des laboratoires collaborateurs	16
4	<u>CONCLUSION</u>	<u>21</u>

Annexe 1 : Protocole de la méthode de référence

Annexe 2 : Sélectivité

1 Introduction

1.1 Référentiel de validation

L'étude préliminaire a pour but d'évaluer les performances du test RIDASCREEN *Salmonella* par rapport à la méthode de référence NF EN ISO 6579 selon le référentiel NF EN ISO 16140. Les caractéristiques suivantes sont étudiées :

- Détermination de l'exactitude relative, de la sensibilité relative et de la spécificité relative de la méthode alternative et de la méthode de référence,
- Niveau de détection relatif de la méthode alternative et de la méthode de référence,
- Sélectivité de la méthode alternative (inclusivité et exclusivité),
- Praticabilité de la méthode alternative.

1.2 Méthode alternative

Le test RIDASCREEN *Salmonella* est basé sur une réaction immuno-enzymatique de type ELISA après amplification.

Les échantillons enrichis sont distribués dans les puits de la microplaque préalablement identifiés. Hautement spécifiques, les anticorps coatés capturent de manière sélective les salmonelles présentes. Les lavages permettent d'éliminer toute substance non spécifique. Les cellules capturées vont alors se multiplier après incubation dans un bouillon d'enrichissement (Bouillon *Salmonella*) jusqu'à atteindre un niveau détectable. Les anticorps marqués par une enzyme spécifique aux salmonelles (Conjugué) sont alors ajoutés. La présence des salmonelles est révélée par la dégradation du substrat par l'enzyme du conjugué, qui se traduit par une coloration bleue avant l'ajout de la solution stop. Les résultats peuvent être lus visuellement ou par un lecteur de microplaque.

Lecture des résultats

Lecture visuelle

Contrôle positif : couleur jaune

Contrôle négatif : incolore ou jaune très clair.

- Un échantillon est considéré présumé positif lorsque les contrôles sont valides et l'échantillon est significativement plus coloré que le contrôle négatif sans être obligatoirement aussi coloré que le contrôle positif.

- Un échantillon est considéré négatif lorsque les contrôles sont valides et l'échantillon est moins ou aussi coloré que le contrôle négatif.

Avec lecteur de microplaque

Lecture automatique (450 ± 10) nm avec un filtre de référence à (620 ± 10) nm

D.O. du contrôle négatif $< 0,150$

D.O. du contrôle positif $\geq 1,000$

- Un échantillon est considéré présumé positif lorsque les contrôles sont valides et sa densité optique $> 0,200$
- Un échantillon est considéré douteux lorsque les contrôles sont valides et sa densité optique est comprise entre 0,185 et 0,200.
- Un échantillon est considéré négatif lorsque les contrôles sont valides et sa densité optique est $< 0,185$

Confirmation des résultats positifs

Les résultats présumés positifs et douteux sont confirmés par un isolement sur géloses sélectives (Hektoën et XLD) à partir du bouillon *Salmonella*, suivi de tests biochimiques et sérologiques.

Remarque : Dans le cadre de cette étude, en cas d'absence de colonies suspectes ou en cas de présence d'une flore interférente sur les milieux sélectifs, un repiquage de 0,1 mL du bouillon *Salmonella* en bouillon RVS a été réalisé. Le bouillon sélectif est incubé à (24 ± 3) heures à (41.5 ± 1)°C avant isolement sur les géloses XLD et HEKTOEN.

Le protocole de la méthode RIDASCREEN *Salmonella* est représenté dans **la figure 1**.

Figure 1 : Protocole de la méthode alternative

ETAPE 1 : PRE-ENRICHISSEMENT*

X g (mL) d'échantillon + 9 X mL d'eau peptonée tamponnée
Incubation à (37 ±1) °C de 16 à 20 heures

ETAPE 2 : CAPTURE DES CELLULES

Transfert de 100 µL de la suspension mère incubée et les contrôles (positif et négatif) dans différents puits de la microplaque
Incubation à (37 ±1) °C pendant 30 minutes

LAVAGE

Ajout de 300 µL de la solution de lavage préchauffée à 37 °C pour un rinçage des puits
(l'opération est répétée 7 fois)

ETAPE 3 : AMPLIFICATION

Ajout de 250 µL d'un bouillon (bouillon *Salmonella*)
Incubation à (37 ±1) °C pendant 5,5 à 6 heures

TRANSFERT

Transfert du bouillon enrichi de l'ensemble des puits dans une nouvelle plaque
La plaque est conservée pour la confirmation des résultats présumés positifs

ETAPE 4 : CONJUGUE

Ajout de 100 µL de conjugué dans chaque puits
Incubation pendant 30 minutes à (37 ±1) °C

LAVAGE

Ajout de 300 µL de la solution de lavage préchauffée à 37 °C pour un rinçage des puits
(l'opération est répétée 7 fois)

ETAPE 5 : SUBSTRAT

Ajout de 100 µL de substrat dans chaque puits
Incubation à température ambiante (20-25 °C) et à l'obscurité pendant 15 minutes
Ajout 100 µL de solution d'arrêt dans chaque puits

ETAPE 6 : LECTURE

Lire les résultats à l'œil nu ou au moyen d'un lecteur de D.O.

Si le test est positif, une confirmation doit être réalisée à partir du bouillon *Salmonella*. Les tests classiques doivent être réalisés, après purification, selon les méthodes normalisées (NF, EN ou ISO)

* : pour les matrices acides et les matrices produisant des molécules acides, l'eau peptonée tamponnée modifiée doit être utilisée

1.3 Domaine d'application

Tous produits d'alimentation humaine et animale, ainsi que les échantillons d'environnement (hors environnement d'élevage).

1.4 Méthode de référence

La norme NF EN ISO 6579 (2002), méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp a été utilisée pour l'étude comparative. Le protocole de la méthode est représenté dans l'annexe 1.

2 Résultats de l'étude préliminaire

L'ensemble des essais effectués avec la méthode alternative a été réalisé avec la limite inférieure du temps d'incubation.

2.1 Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative

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 et prélèvement d'environnement.

Les résultats positifs avec la méthode alternative ainsi que les résultats discordants sont confirmés selon le protocole de la méthode de référence.

2.1.1 Nombre et nature des échantillons

Les catégories suivantes ont été étudiées :

- les produits carnés,
- les produits laitiers,
- les produits de la mer & végétaux,
- divers (ovo-produits, pâtisseries et plats cuisinés)
- alimentation animale,
- échantillons d'environnement.

380 échantillons ont été analysés, les catégories et les types de matrices sont répertoriés dans le tableau suivant.

Catégories	Types	Nombre de positifs ^a	Nombre de négatifs	Total
Produits carnés	Viandes crues	12	21	33
	Volaille	14	8	22
	Charcuteries	7	7	14
	Total	33	36	69
Produits laitiers	Fromages pasteurisés	3	12	15
	Laits traités et poudres de lait	9	11	20
	Fromages au lait cru /lait cru	20 ^b	9 ^b	29 ^b
	Total	32	32	64
Produits de la mer et végétaux	Poissons et crustacés	13	22	35
	Végétaux prêts à consommer	14	4	18
	Végétaux crus	5	4	9
	Total	32	30	62
Divers	Ovo-produits	15	12	27
	Pâtisseries	12	5	17
	Plats cuisinés	3	13	16
	Total	30	30	60
Alimentation animale	Farines, granulés et croquettes	23	20	43
	Pâtées (anx domestiques)	6	6	12
	Viandes	3	5	8
	Total	32	31	63
Echantillon d'environnement	Eaux diverses	8	10	18
	Prélèvement de surface	20	12	32
	Ecouvillons de siphons, égouts	2	10	12
	Total	30	32	62

a: Résultats positifs par l'une ou l'autre des deux méthodes

b : Echantillons analysés lors de la première étude

2.1.2 Contamination artificielle des échantillons

Des contaminations artificielles ont été réalisées à l'aide de souches stressées selon les exigences de la norme EN ISO 16140 et du Bureau Technique.

Les contaminations artificielles ont été réalisées sur 143 échantillons, soit 75,7% d'échantillons artificiellement contaminés (le nombre d'échantillon naturellement contaminés étant de 46).

Les couples de résultats des méthodes de référence et alternative par catégories d'échantillons sont présentés dans les tableaux suivants :

Tous produits

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	PA= 184	PD= 1
Méthode alternative négative (A-)	ND= 4	NA= 191 PPNA = 30

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

A+ : positifs confirmés

A- : négatifs immédiats et négatifs après confirmation quand présomptifs positifs

Produits carnés

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	PA= 33	PD= 0
Méthode alternative négative (A-)	ND= 0	NA= 36 PPNA = 11

Produits laitiers

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	PA= 31	PD= 0
Méthode alternative négative (A-)	ND= 1	NA= 32 PPNA = 3

Produits de la mer & végétaux

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	PA= 31	PD= 0
Méthode alternative négative (A-)	ND= 1	NA= 30 PPNA = 5

Divers

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	NA= 30 PPNA = 3

Alimentation animale

Réponse	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	PA= 31	PD= 1
Méthode alternative négative (A-)	ND= 0	NA= 31 PPNA = 2

Echantillons de l'environnement

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	NA= 32 PPNA = 6

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

Les résultats obtenus permettent de calculer l'exactitude relative, la spécificité relative et la sensibilité relative pour toutes les catégories testées, selon le référentiel NF EN ISO 16140.

Catégorie de produit	PA	NA	ND	PD	N	AC (%)	N+	SE (%)	N-	SP (%)
Produits carnés	33	36	0	0	69	100	33	100	36	100
Produits laitiers	31	32	1	0	64	98	32	97	32	100
Produits de la mer & végét.	31	30	1	0	62	98	32	97	30	100
Divers	28	30	2	0	60	97	30	93	30	100
Alimentation animale	31	31	0	1	63	98	31	100	32	97
Echantillons de l'environnement	30	32	0	0	62	100	30	100	32	100
Total	184	191	4	1	380	99	188	98	192	99

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

Le tableau suivant présente les limites de confiances inférieures calculées selon le même référentiel.

	Exactitude relative			Sensibilité relative			Spécificité relative		
	N	AC (%)	LCL (%)	N+	SE (%)	LCL (%)	N-	SP (%)	LCL (%)
Produits carnés	69	100	98	33	100	98	36	100	98
Produits laitiers	64	98	96	32	97	95	32	100	98
Produits de la mer & végétaux	62	98	96	32	97	95	30	100	98
Divers	60	97	96	30	93	88	30	100	98
Alimentation animale	63	98	96	31	100	98	32	97	95
Ech. environnement	62	100	98	30	100	98	32	100	98
Total	380	99	98	188	98	96	190	99	98

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

Les valeurs en pourcentage obtenues pour les trois critères concernant la méthode alternative sont les suivantes :

Exactitude relative (AC) = 99 %,

Sensibilité relative (SE) = 98 %,

Spécificité relative (SP) = 99 %.

La sensibilité des deux méthodes est recalculée en tenant compte de l'ensemble des résultats positifs confirmés. Le pourcentage de sensibilité est le suivant :

Méthodes	Alternative	Référence
Sensibilité en %	$(PA+PD) / (PA+PD+ND) = 98$	$(PA+ND) / (PA+PD+ND) = 99$

2.1.4 Analyse des résultats discordants

Cinq résultats discordants ont été obtenus entre la méthode alternative et la méthode de référence. Selon l'annexe F de la norme NF EN ISO 16140, le nombre de discordants étant inférieur à 6, aucun test statistique ne doit être réalisé pour comparer les deux méthodes.

Echantillon LN30 /RD 1116 (ND)

Il s'agit d'un échantillon de fromage au lait cru (Maroilles) artificiellement contaminé par une souche de *S. Agona* stressée. La méthode alternative a donné un résultat négatif et les isolements réalisés à partir du bouillon *Salmonella* n'ont pas mis en évidence la présence du germe recherché.

Echantillon MP25 /RD 1658(ND)

Il s'agit d'un échantillon de salade de fruits frais artificiellement contaminé par une souche de *S. Poona* stressée. Le test Ridascreen a donné un résultat négatif alors que la méthode de référence a mis en évidence la présence de *Salmonella*. Des colonies caractéristiques ont été retrouvées à partir du bouillon *Salmonella*, uniquement sur le milieu Hektöen. La mesure du pH du bouillon de préenrichissement (eau peptonée tamponnée) après incubation étant de 4,7, l'eau peptonée doublement tamponnée est recommandée pour ce type d'échantillon. Un pH bas empêcherait d'atteindre le seuil de détection de la méthode alternative.

Echantillon OP16 /RD 1649(ND)

Il s'agit d'un échantillon de cheese cake artificiellement contaminé par une souche de *S. Yoruba* stressée. La méthode de référence a donné un résultat positif alors que la méthode alternative a donné un résultat négatif (même si la valeur de DO est proche du seuil : 0,172). Des colonies caractéristiques ont été retrouvées à partir du bouillon *Salmonella*. Le niveau de détection de la méthode alternative semble ne pas avoir été atteint. Le taux d'inoculation de cet échantillon était de 6 CFU dans 25 g de produit.

Echantillon OP23 /RD 1570 (ND)

Il s'agit d'un échantillon d'éclair au chocolat artificiellement contaminé par une souche de *S. Havana* stressée. La méthode alternative a donné un résultat négatif. Les isolements réalisés à partir du bouillon *Salmonella* n'ont mis en évidence aucune colonie caractéristique sur les géloses sélectives. La méthode de référence a permis de retrouver *Salmonella* uniquement à partir du bouillon RVS. Dans ce cas aussi, il semblerait que le seuil de sensibilité de la méthode alternative n'ait pas été atteint.

Echantillon AP8 /RD 1251 (PD)

Il s'agit d'un échantillon de farine animale naturellement contaminé. La méthode alternative a donné un résultat positif alors que la méthode de référence n'a pas mis en évidence la présence de *Salmonella*. Les isolements à partir des bouillons *Salmonella* ont permis de retrouver le germe cible seulement à partir du milieu Hektöen.

Echantillons positifs par la méthode alternative non confirmés

Le taux d'échantillons positifs non confirmés est de 15,7%.

30 échantillons ont donné un résultat présumé positif par la méthode alternative et négatif par la méthode de référence. Les confirmations n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de *Salmonella*. Quelques colonies suspectes ou présentes sur les milieux sélectifs ont été testées en culture pure.

Pour certains échantillons, il a été possible de mettre en évidence une réaction croisée avec des souches appartenant à la famille des entérobactéries :

- *Citrobacter freundii* (échantillons RD1525 :Tomme de chèvre, RD 1497 : Siphon évier, RD 1298 : Chou-fleur, RD 1304 : carottes râpées nature)
- *Escherichia coli* (échantillons RD 1449 : mélange de poulet mariné, RD577 : poitrine d'agneau, RD 1265 : Foie de porc, RD 1252 : Dés de poulet, RD 1736 : farine de viande).
- *Enterobacter cloacae* (échantillon RD1306 : Melon)

2.1.5 Lecture visuelle du test de la méthode alternative

La lecture visuelle a été effectuée selon 2 modalités :

- une 1^{ère} lecture 15 minutes après l'ajout du substrat. L'échantillon est présumé positif si une coloration bleue apparaît.
- Une seconde lecture après ajout de la solution d'arrêt. L'échantillon est présumé positif si une coloration jaune apparaît.

De plus, une lecture automatique a également été effectuée à 450nm.

L'ensemble des essais a permis de conclure qu'il y avait une parfaite concordance entre la lecture visuelle après ajout de la solution d'arrêt et la lecture automatique. Pour des valeurs de DO proches du seuil 0,180-0,200, la coloration bleue n'est pas discernable tandis qu'une coloration jaune apparaît après l'addition de la solution stop.

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

L'objectif est de déterminer la concentration minimale de *Salmonella* spp détectable dans un aliment par les deux méthodes. Les contaminations artificielles ont été réalisées selon les exigences de la norme EN ISO 16140 et du Bureau Technique Microbiologie.

2.2.1 Matrices utilisées

Les différents couples « matrice-souche » étudiés sont :

Souche (origine)	Aliment	Flore totale ^a
<i>S.</i> Typhimurium (viande hachée)	Viande hachée	1,7.10 ⁷
<i>S.</i> Dublin (Lait)	Lait cru	8,0.10 ³
<i>S.</i> Enteritidis (Moules)	Filet de lieu noir	5,4.10 ⁴
<i>S.</i> Enteritidis (Ovoproduit)	Œufs entiers	2,8.10 ¹
<i>S.</i> Infantis (Farine de viande)	Pâtée pour chat	1,8.10 ³
<i>S.</i> Typhimurium (table de découpe)	Eau de process	1,4.10 ³

a : CFU/g ou mL

2.2.2 Protocole de contamination

Cinq à six niveaux de contamination ont été testés dont le contrôle négatif.

Six répliquats ont été réalisés pour chaque niveau. Les contaminations ont été effectuées directement dans les bouillons de pré-enrichissement pour les deux méthodes, 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 g (ou mL) 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 g (ou mL) de produit. Pour l'ensemble des niveaux de contamination, l'homogénéité des inoculi est vérifiée par 30 dénombrements en gélose TSA et le calcul de l'intervalle de confiance selon la loi de Poisson est effectué.

2.2.3 Résultats des essais

Les limites de détection pour chacune des méthodes et pour chaque catégorie de produits sont résumées dans le tableau suivant :

		Niveau de détection relatif selon le test de Spearman-Kræber	
Souche	Aliment	Méthode de référence (*)	Méthode alternative
S. Typhimurium	Viande hachée	0,567 ^a [0,386 ; 0,833]	0,778 ^a [0,459 ; 1,320]
S. Dublin	Lait cru	0,687 ^a [0,351 ; 1,346]	0,687 ^a [0,351 ; 1,346]
S. Enteritidis	Filet de lieu noir	0,719 ^a [0,490 ; 1,057]	0,660 ^a [0,449 ; 0,969]
S. Enteritidis	Œufs entiers	0,713 ^a [0,486 ; 1,047]	0,713 ^a [0,486 ; 1,047]
S. Infantis	Pâtée pour chat	0,766 ^a [0,452 ; 1,300]	0,870 ^a [0,538 ; 1,407]
S. Typhimurium	Eau de process	0,493 ^a [0,370 ; 0,658]	0,458 ^a [0,343 ; 0,611]

a : cellules dans 25 g (mL)

Les limites de détection avec deux chiffres significatifs sont présentées dans le tableau suivant :

		Niveau de détection relatif selon le test de Spearman-Kræber	
Souche	Aliment	Méthode de référence (*)	Méthode alternative
S. Typhimurium	Viande hachée	0,6 ^a [0,4 ; 0,8]	0,8 ^a [0,5 ; 1,3]
S. Dublin	Lait cru	0,7 ^a [0,4 ; 1,3]	0,7 ^a [0,4 ; 1,3]
S. Enteritidis	Filet de lieu noir	0,7 ^a [0,5 ; 1,1]	0,7 ^a [0,4 ; 1,0]
S. Enteritidis	Œufs entiers	0,7 ^a [0,5 ; 1,0]	0,7 ^a [0,5 ; 1,0]
S. Infantis	Pâtée pour chat	0,8 ^a [0,5 ; 1,3]	0,9 ^a [0,5 ; 1,4]
S. Typhimurium	Eau de process	0,5 ^a [0,4 ; 0,7]	0,5 ^a [0,3 ; 0,6]

a : cellules dans 25 g (mL)

2.2.4 Conclusion

La limite de détection de la méthode alternative varie de 0,3 à 1,4 CFU /25 mL (g) et celle de la méthode de référence varie de 0,4 à 1,3 CFU /25 mL (g) pour l'ensemble des catégories

2.3 Sélectivité

L'objectif de cette étape est de s'assurer que toutes les souches de *Salmonella* donnent une réaction positive avec la méthode alternative et que toutes les souches non-*Salmonella* donnent une réaction négative avec la même méthode.

2.3.1 Protocoles d'essai

Souches cibles : les souches testées subissent 2 repiquages successifs avant leur utilisation. Le dernier repiquage est réalisé dans l'eau peptonée tamponnée. Le niveau d'inoculation est de 100 ± 50 CFU par 225 mL pour les souches cibles.

Pour les souches non cibles, les souches testées ont subi 2 repiquages successifs avant leur utilisation. Le dernier repiquage est réalisé dans le bouillon non sélectif TSB. Le niveau d'inoculation est d'environ 10^6 CFU/mL.

2.3.2 Résultats des essais

Les résultats sont présentés en **annexe 2**.

Les essais ont montré que l'ensemble des souches ont été détectées par le test Ridascreen.

33 souches non cibles ont été testées.

2 souches ont donné un résultat positif par la méthode alternative. Il s'agit de 2 souches de collection de *Citrobacter freundii* (R35 : CIP 5362 et R40 : ATCC 8090). Une réaction positive est également obtenue lorsque le protocole complet de la méthode alternative est appliqué.

2.4 Praticabilité

La praticabilité est étudiée en renseignant les 13 critères définis par le Bureau Technique.

1- Mode de conditionnement des éléments de la méthode

Le kit est conditionné en coffret de 96 tests contenant :

- une microplaque de 96 puits (12 barrettes de 8 puits sécables) dans un sachet fermé hermétiquement,
- les différents réactifs conditionnés en flacons ou sachets,

2- Volume des réactifs

Précisions sur la notice (paragraphe composition du coffret)

- témoin négatif : 2 mL
- témoin positif : 2mL
- conjugué : 10 mL
- substrat et chromogène : 10 mL
- solution stop : 14 mL
- solution de lavage : 2 sachets de poudre pour la reconstitution de 2 litres
- Bouillon *Salmonella* : 2 sachets de poudre pour la reconstitution de 100 mL

3- Conditions de stockage des éléments (péremption des produits non ouverts)

Précision sur les flacons et la température de stockage du test se situe entre 2 °C et 8 °C. La validité du test est au minimum de 6 mois.

4- Modalités d'utilisation après première utilisation

Chaque réactif doit être conservé entre 2°C et 8°C.

Les puits non utilisés doivent être remis dans leur sachet d'origine fermé.

5- Equipements ou locaux spécifiques nécessaires

Parmi les équipements nécessaires il faut (paragraphe matériels nécessaires non fournis) :

- étuve réglée à 37°C ± 1 °C bain
- matériel courant de laboratoire
- microplaque pour transfert et conservation du bouillon *Salmonella*
- laveur de microplaque ou multi pipette (optionnel)
- lecteur de microplaque pour lecture à 450±10nm (620±10nm réf.) (optionnel)

6- Réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer

Les réactifs sont prêts à l'emploi à l'exception du Bouillon *Salmonella* et de la solution de lavage.

7- Durée de formation de l'opérateur non initié à la méthode

Pour un opérateur formé aux techniques classiques de microbiologie, la formation à la technique nécessite moins de un jour.

8- Temps réel de manipulation et flexibilité de la technique

Etape	Temps en minutes					
	M.A.			M.R.		
	1 analyse	10 analyses	50 analyses	1 analyse	10 analyses	50 analyses
Prise d'essai et mise en suspension	3	23	97	3	23	97
Inoculation des bouillons sélectifs	/	/	/	2	18	80
Réalisation du test ELISA	35	42	60	/	/	/
Inoculation et incubation Des milieux sélectifs	1	9	40	2	18	80
Lecture des boîtes	0,3	3	15	0,6	6	30
Confirmation biochimique ^a	8	70	250	16	140	500
Confirmation sérologique	3	30	150	3	30	150
Total	50,3	177	612	26,6	235	937

a : très variable

9- Délai d'obtention des résultats

Premier cas : échantillons négatifs

Etape	Méthode alternative	Méthode de référence
Début analyse : pré-enrichissement	J0	J0
Repiquage en bouillons sélectifs	-	J1
Réalisation du test ELISA	J1	-
Isolement sur milieux sélectifs	-	J2
Lecture XLD et autre milieu au choix	-	J3
Tests de confirmation (purification, galerie, sérologie)	-	J5 à J7*

* : 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 : pré-enrichissement	J0	J0
Repiquage en bouillons sélectifs	J1	J1
Réalisation du test ELISA	J1	
Isolement sur milieux sélectifs	J1 à J2	J2
Lecture XLD et autre milieu au choix	-	J3
Tests de confirmation (purification, galerie, sérologie)	J3 à J7	J5 à J7

10- Type de qualification de l'opérateur

Niveau identique à celui nécessaire pour la méthode de référence.

11- Etapes communes avec la méthode de référence

Le pré-enrichissement en eau peptonée tamponnée.

12- Traçabilité des résultats d'analyse

Une feuille de travail est donnée avec le kit

13- Maintenance par le laboratoire

Pas de maintenance particulière sauf celle liée au spectrophotomètre et au laveur automatique.

3 Etude collaborative

L'étude collaborative a été réalisée conformément au référentiel NF EN ISO 16140.

L'objectif principal de cette étude est de déterminer la variabilité des résultats obtenus dans différents laboratoires analysant des échantillons identiques et de comparer ces résultats dans le cadre de l'étude comparative des méthodes.

3.1 Mise en œuvre de l'étude collaborative

3.1.1 Laboratoires collaborateurs

L'étude collaborative a été réalisée par le laboratoire expert et quinze laboratoires collaborateurs.

3.1.2 Vérification de l'absence de *Salmonella* spp dans la matrice utilisée

Avant les contaminations artificielles, l'absence de *Salmonella* spp a été vérifiée sur le lot de lait pasteurisé (5 prises d'essai ont été analysées).

3.1.3 Stabilité de la souche dans la matrice lait pasteurisé

La stabilité de la souche, dans la matrice lait pasteurisé, a été évaluée sur 6 jours à $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$.

La souche utilisée est *Salmonella* Enteritidis (souche sauvage isolée à partir d'ovoproduit). Deux types d'analyse ont été réalisés.

(1) - Inoculation d'environ 10 cellules dans 25 mL de lait pasteurisé. Les échantillons ont été analysés à J0, J+1, J+2, J+3 et J+6 par la méthode de référence et par la méthode alternative.

(2) - Inoculation d'environ 10^4 cellules dans 25 mL de lait pasteurisé. Les échantillons ont été analysés à J0, J+1, J+2, J+3, J+4 et J+6 par dénombrement sur milieu Hektoën.

Les résultats sont synthétisés dans le tableau 1.

Jour	Méthode alternative (1)	Méthode de référence (1)(*)	Dénombrement sur Hektoën (2)
J0	Présence dans 25 mL	Présence dans 25 mL	$4,8.10^2$ CFU/mL
J+1	Présence dans 25 mL	Présence dans 25 mL	$3,3.10^2$ CFU/mL
J+2	Présence dans 25 mL	Présence dans 25 mL	$4,1.10^2$ CFU/mL
J+3	Présence dans 25 mL	Présence dans 25 mL	$3,2.10^2$ CFU/mL
J+4	/	/	$3,3.10^2$ CFU/mL
J+6	Présence dans 25 mL	Présence dans 25 mL	$3,1.10^2$ CFU/mL

Tableau 1 : Résultats de l'étude de stabilité de la souche *S. Enteritidis* dans la matrice lait pasteurisé.

L'ensemble des résultats montre que la souche de *Salmonella* Enteritidis utilisée est stable pendant 6 jours à $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ dans la matrice lait pasteurisé.

3.1.4 Préparation et inoculation des échantillons

La matrice est inoculée avec la souche de *S. Enteritidis* selon le protocole des petits nombres.

Trois taux ont été testés :

0 cellule dans 25 mL (L0),

3 cellules dans 25 mL (L1),

30 cellules dans 25 mL (L2)

La matrice a été répartie à raison de 25 mL dans des flacons stériles à capuchon étanche. Chaque flacon a été inoculé individuellement et homogénéisé. Huit échantillons par taux et par laboratoire ont été préparés. Chaque laboratoire a reçu 24 échantillons à tester et un échantillon pour quantifier la flore endogène de la matrice.

Matrice alimentaire	Flore totale (CFU/ mL)	Taux cibles (cellules/25 mL)	Taux réels (cellules/25 mL)	Intervalle de confiance
Lait pasteurisé	10	0	0	-
		3	2,9 ^a	[0,6] ^b
		30	27,8 ^a	[17,38] ^b

a : moyenne de 30 dénombrements, b : selon la loi de Poisson

Tableau 2 : Résultats de dénombrements des inocula de *Salmonella* Enteritidis et de la flore totale dans le lait pasteurisé

3.1.5 Etiquetage des échantillons

L'étiquetage des flacons a été réalisé de la façon suivante :

- un code permettant d'identifier le laboratoire : A à O,
 - un code permettant d'identifier chaque échantillon, connu uniquement du laboratoire expert,
- Les échantillons et les témoins température (échantillon d'eau contenant un thermobouton) ont été stockés à 4°C avant expédition.

Taux (UFC / mL)	Codes échantillon
0	1/2/7/10/11/14/15/24
3	4/5/6/17/19/20/22/23
30	3/8/9/12/13/16/18/21

Tableau 3 : Codes échantillon attribués à chaque niveau de contamination

3.1.6 Expédition des échantillons

Les échantillons ont été expédiés dans un kit froid le 19 mai 2008. Le transport a été confié à CHRONOPOST.

3.1.7 Réception et analyse des échantillons par les laboratoires collaborateurs

Les colis sont arrivés en moins de 24 heures chez les laboratoires collaborateurs à l'exception du colis à destination de l'Allemagne.

La température du pot témoin a été prise dès réception du colis et le thermobouton expédié au laboratoire expert pour la lecture des données. Les échantillons ont été analysés dans la journée (20 mai 2008). Le laboratoire expert a analysé, en parallèle, une série d'échantillons dans les mêmes conditions avec la méthode alternative et la méthode de référence.

3.2 Résultats

3.2.1 Température et état des échantillons à réception

Laboratoire	Température (°C)	Etat des échantillons	Jour de réception
A	2,2	Bon	J1
B	5,5	Bon	J1
C	8,6	Bon	J1
D	4,9	Bon	J1
E	3,7	Bon	J1
F	4,3	Bon	J1
G	6,9	Bon	J1
H	4,0	Bon	J1
I	7,1	Bon	J1
J	7,0	Bon	J2
K	2,6	Bon	J1
L	4,4	Bon	J1
M	3,5	Bon	J1
N	2,7	Bon	J1
O	5,0	Bon	J1

Tableau 4 : Température et état des échantillons à réception chez les laboratoires participants

L'analyse des profils thermiques des différents thermoboutons montre, pour l'ensemble des laboratoires, une température moyenne de transport des échantillons comprise entre 1,6°C et 3,9°C.

Laboratoire	Température (°C)	
	Moyenne	Ecart-type
A	3,0	1,0
B	2,6	1,1
C	2,7	1,1
D	1,6	1,2
E	2,2	0,9
F	2,0	1,7
G	2,6	1,2
H	2,3	1,1
I	3,9	1,5
J	-	-
K	-	-
L	3,6	1,3
M	3,6	1,7
N	3,6	1,9
O	-	-

Tableau 5 : Données des thermoboutons au cours de l'expédition des échantillons

Les profils thermiques des laboratoires J, K et O n'ont pas pu être établis car les données des thermoboutons n'ont pas pu être récupérées.

Le laboratoire C a indiqué une température à réception de 8,6°C. Cependant, les données du thermobouton ont montré que les conditions de transport sont satisfaisantes (moyenne de l'ordre de 2,7°C). C'est pourquoi les résultats de ce laboratoire pourront être pris en compte. Le laboratoire J a réceptionné les échantillons 2 jours après envoi. Même si la valeur de la température n'a jamais excédé 8,4°C, les données ne pourront pas être intégrées car l'analyse des échantillons n'a pas pu être réalisée le même jour que l'ensemble des laboratoires participants.

3.2.2 Dénombrements de la flore totale

Pour l'ensemble des laboratoires, les dénombrements de la flore totale aérobie à 30°C varient entre <1 et 100 CFU/mL.

3.2.3 Résultats du laboratoire expert

Les résultats obtenus par le laboratoire expert sont résumés dans le tableau 6.

Niveau de contamination	Méthode alternative	Méthode de référence (*)
L0	0/8	0/8
L1	8/8	8/8
L2	8/8	8/8

Tableau 6 : Résultats positifs obtenus par le laboratoire expert avec les deux méthodes

Les résultats obtenus sont conformes à ceux attendus.

3.2.4 Résultats des laboratoires collaborateurs

L'ensemble des résultats est résumé dans le tableau 7.

10 laboratoires ont obtenus des résultats parfaitement concordants entre les 2 méthodes

- 9 laboratoires (A, B, C, D, F, H, I, L et N) ont obtenu des résultats conformes à ceux attendus, c'est-à-dire tous les échantillons non contaminés ont donné un résultat négatif et tous les échantillons artificiellement contaminés ont donné un résultat positif.
- Le laboratoire M a obtenu, pour un échantillon contaminé au faible taux, un résultat négatif avec les 2 méthodes.

Le laboratoire G a retrouvé 3 échantillons contaminés au faible taux G19, G20 et G22 négatifs par la méthode alternative alors qu'ils ont été donnés positifs avec la méthode de référence. Pour ces échantillons, le laboratoire indique que les isolements réalisés à partir du bouillon *Salmonella* n'ont pas mis en évidence de colonies caractéristiques sur les géloses sélectives. Une reprise de l'analyse avec la méthode alternative a été réalisée par ce laboratoire à partir des bouillons de pré-enrichissement : un résultat positif confirmé a été obtenu pour ces échantillons. Malgré des résultats concordants lors du second essai, les premiers résultats obtenus ont été intégrés dans l'analyse globale de cette étude.

Le laboratoire O a obtenu :

- 2 échantillons contaminés au faible taux négatifs par les 2 méthodes (échantillons O4 et O22)
- 1 échantillon initialement non contaminé positif, uniquement par la méthode de référence, (échantillon O10). Les tests de confirmation, réalisés par le laboratoire expert, indiquent que la souche retrouvée dans cet échantillon est la même que celle utilisée pour les contaminations artificielles, ce qui valide l'hypothèse de la contamination croisée.

Les résultats de 2 laboratoires (E et J) n'ont pas été transmis.

- le laboratoire E a indiqué qu'il avait rencontré des dysfonctionnements lors de certaines manipulations sur l'automate l'empêchant de fournir des résultats fiables.
- le laboratoire J n'a pas reçu les échantillons dans les délais. Le report des analyses a occasionné des difficultés au niveau de leur organisation interne.

Le laboratoire K a fourni des résultats en précisant qu'il avait rencontré des problèmes de contamination lors d'un premier essai avec la méthode alternative. Même si les résultats finaux sont concordants entre les 2 méthodes, les données de ce laboratoire n'ont pas été intégrées dans l'analyse finale puisque le premier test obtenu avec la méthode alternative a été invalide suite à des problèmes de contamination probablement dus à un lavage insuffisant des puits.

L'analyse finale des résultats a donc été effectuée à partir des données de 12 laboratoires.

Laboratoire	Niveau de contamination		
	L0	L1	L2
A	0/8	8/8	8/8
B	0/8	8/8	8/8
C	0/8	8/8	8/8
D	0/8	8/8	8/8
E	-	-	-
F	0/8	8/8	8/8
G	0/8	5/8	8/8
H	0/8	8/8	8/8
I	0/8	8/8	8/8
J	-	-	-
K	-	-	-
L	0/8	8/8	8/8
M	0/8	7/8	8/8
N	0/8	8/8	8/8
O	0/8	6/8	8/8
Total	0/96 ^a	90/96 ^b	96/96 ^c

a FP : faux positifs obtenus avec la méthode alternative

b TP_{1a} : vrais positifs obtenus au niveau L1 avec la méthode alternative

c TP_{2a} : vrais positifs obtenus au niveau L2 avec la méthode alternative

Tableau 7 : Résultats positifs obtenus par l'ensemble des laboratoires collaborateurs pour la méthode alternative

Laboratoire	Niveau de contamination		
	L0	L1	L2
A	0/8	8/8	8/8
B	0/8	8/8	8/8
C	0/8	8/8	8/8
D	0/8	8/8	8/8
E	-	-	-
F	0/8	8/8	8/8
G	0/8	8/8	8/8
H	0/8	8/8	8/8
I	0/8	8/8	8/8
J	-	-	-
K	-	-	-
L	0/8	8/8	8/8
M	0/8	7/8	8/8
N	0/8	8/8	8/8
O	1/8	6/8	8/8
Total	1/96 ^a	93/96 ^b	96/96 ^c

a FP : faux positifs obtenus avec la méthode de référence

b TP_{1r} : vrais positifs obtenus au niveau L1 avec la méthode de référence

c TP_{2r} : vrais positifs obtenus au niveau L2 avec la méthode de référence

Tableau 8 : Résultats obtenus par l'ensemble des laboratoires collaborateurs pour la méthode de référence

1-Calcul des pourcentages de spécificité (SP) et de sensibilité (SE) pour la méthode alternative et la méthode de référence

	Méthode alternative	Méthode de référence
SP (niveau L0)	100%	99%
SE (niveau L1)	94%	97%
SE (niveau L2)	100%	100%
SE (niveau L1+L2)	97%	98%

SP = $[1 - (FP/N_-)] \times 100\%$

N₋ : nombre total des essais L0

FP : nombre de faux positifs

SE = $(TP/N_+) \times 100\%$

N₊ : nombre total des essais L1 ou L2

TP : nombre de vrais positifs

2-Calcul de l'exactitude relative pour les différents niveaux de contamination

Méthode alternative	Méthode de référence		Total
	+	-	
+	PA = 0	PD = 0	0
-	ND = 1 PPND = 0	NA = 95 PPNA = 0	96
Total	1	95	96

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

Tableau 9 : Couples de résultats de la méthode alternative et de la méthode de référence pour le niveau de contamination L0

Méthode alternative	Méthode de référence		Total
	+	-	
+	PA = 90	PD = 0	90
-	ND = 3 PPND = 0	NA = 3 PPNA = 0	6
Total	93	3	96

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

Tableau 10 : Couples de résultats de la méthode alternative et de la méthode de référence pour le niveau de contamination L1

Méthode alternative	Méthode de référence		Total
	+	-	
+	PA = 96	PD = 0	96
-	ND = 0 PPND = 0	NA = 0 PPNA = 0	0
Total	96	0	96

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

Tableau 11 : Couples de résultats de la méthode alternative et de la méthode de référence pour le niveau de contamination L2

Méthode alternative	Méthode de référence		Total
	+	-	
+	PA = 186	PD = 0	186
-	ND = 4 PPND = 0	NA = 98 PPNA = 0	102
Total	190	98	288

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

Tableau 12 : Couples de résultats de la méthode alternative et de la méthode de référence pour la totalité des résultats

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

Catégorie de produit	PA	NA	ND	PD	N	Exactitude relative AC (%)	N+	Sensibilité relative SE (%)	N-	Spécificité relative SP (%)
Niveau L0	0	95	1	0	96	99	1	-	95	100
Niveau L1	90	3	3	0	96	97	93	97	3	-
Niveau L2	96	0	0	0	96	100	96	100	0	-
Total	186	98	4	0	288	99	190	98	98	100

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

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

4-Calcul des intervalles de confiance

	Exactitude relative			Sensibilité relative			Spécificité relative		
	N	AC(%)	LCL(%)	N+	SE(%)	LCL(%)	N-	SP(%)	LCL(%)
Niveau L0	96	99	98	1	-		95	100	98
Niveau L1	96	97	96	93	97	96	3	-	-
Niveau L2	96	100	98	96	100	98	0	-	-
Total	288	99	98	190	98	96	98	100	98

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

5- Analyse des résultats discordants

Au total, 4 résultats discordants ont été obtenus.

Niveau L0

Pour le laboratoire 0, un échantillon initialement non contaminé a donné un résultat positif uniquement par la méthode de référence. Les colonies caractéristiques ont été mises en évidence à partir des 2 bouillons sélectifs RVS et MKTTn. Les tests de confirmation, réalisés sur les colonies typiques par le laboratoire expert, indiquent que la souche retrouvée dans cet échantillon est la même que celle utilisée pour les contaminations artificielles. Une contamination ou une erreur de sac ont pu se produire au niveau du transfert en bouillons sélectifs.

Niveau L1

Le laboratoire L a obtenu un résultat négatif par la méthode alternative pour 3 échantillons correspondant au faible taux de contamination alors que la méthode de référence a mis en évidence la présence de *Salmonella* dans ces échantillons. Le test a donné un résultat négatif et les isollements réalisés sur géloses sélectives à partir du bouillon *Salmonella* n'ont mis en évidence aucune croissance. Le test de la méthode alternative a de nouveau été réalisé à partir des bouillons de pré-enrichissement et un résultat positif a été confirmé pour ces mêmes échantillons.

Selon l'annexe F de la norme NF EN ISO 16140, le nombre de discordant étant inférieur à 6, aucun test statistique n'est à mettre en oeuvre pour comparer les 2 méthodes

6- Interprétation

6-1 Degré d'accord

C'est le pourcentage de chance de trouver le même résultat pour deux prises d'essai identiques (deux échantillons identiques) analysés dans le même laboratoire dans les conditions de répétabilité.

Le degré d'accord est la moyenne des probabilités que deux réplicats donnent le même résultat pour chaque laboratoire.

Niveau	Méthode alternative	Méthode de référence
L0	100%	98%
L1	91%	95%
L2	100%	100%

Tableau 13 : Degré d'accord par niveau et par méthode

6-2 Concordance

C'est le pourcentage de chance de trouver le même résultat pour deux échantillons identiques analysés dans deux laboratoires différents (conditions de reproductibilité).

La concordance est le pourcentage de toutes les paires donnant les mêmes résultats sur toutes les paires possible de résultats.

Niveau	Méthode alternative	Méthode de référence
L0	100%	98%
L1	84%	90%
L2	100%	100%

Tableau 14 : Concordance par niveau et par méthode

6-3 Odds ratio

Le calcul de *odds ratio* (COR) est défini comme suit

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

Niveau de contamination	Méthode alternative			Méthode de référence		
	Degré d'accord	Concordance	COR	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1	98%	98%	1
L1	91%	84%	1.9	95%	90%	1.1
L2	100%	100%	1	100%	100%	1

Tableau 15 : Calcul de *odds ratio* pour l'ensemble des niveaux de contamination pour les 2 méthodes

Lorsque COR=1, le degré d'accord et la concordance sont égaux. Deux échantillons identiques ont autant de chance de donner le même résultat s'ils sont analysés par le même laboratoire que s'ils sont analysés par des laboratoires différents.

Lorsque COR>1, la concordance est plus petite que le degré d'accord. Deux échantillons identiques ont plus de chance de donner le même résultat s'ils sont analysés par le même laboratoire que s'ils sont analysés par des laboratoires différents.

6-4 Comparaison des valeurs d'exactitude relative (AC), de spécificité (SP) et de sensibilité (SE)

Le tableau 16 synthétise les valeurs obtenues pour ces paramètres pour l'étude préliminaire et pour l'étude collaborative.

	Etude préliminaire	Etude collaborative
Exactitude relative (AC)	99 %	99 %
Spécificité (SP)	99 %	100 %
Sensibilité (SE)	98 %	98 %

Tableau 16: Comparaison des valeurs de AC, SP et SE entre les études préliminaire et collaborative

4 Conclusion

Les performances du test Ridascreen *Salmonella* pour la détection des Salmonelles sont comparables à celles de la méthode de référence NF EN ISO 6579. Cette étude a porté sur 380 échantillons d'alimentation humaine et animale et échantillons d'environnement.

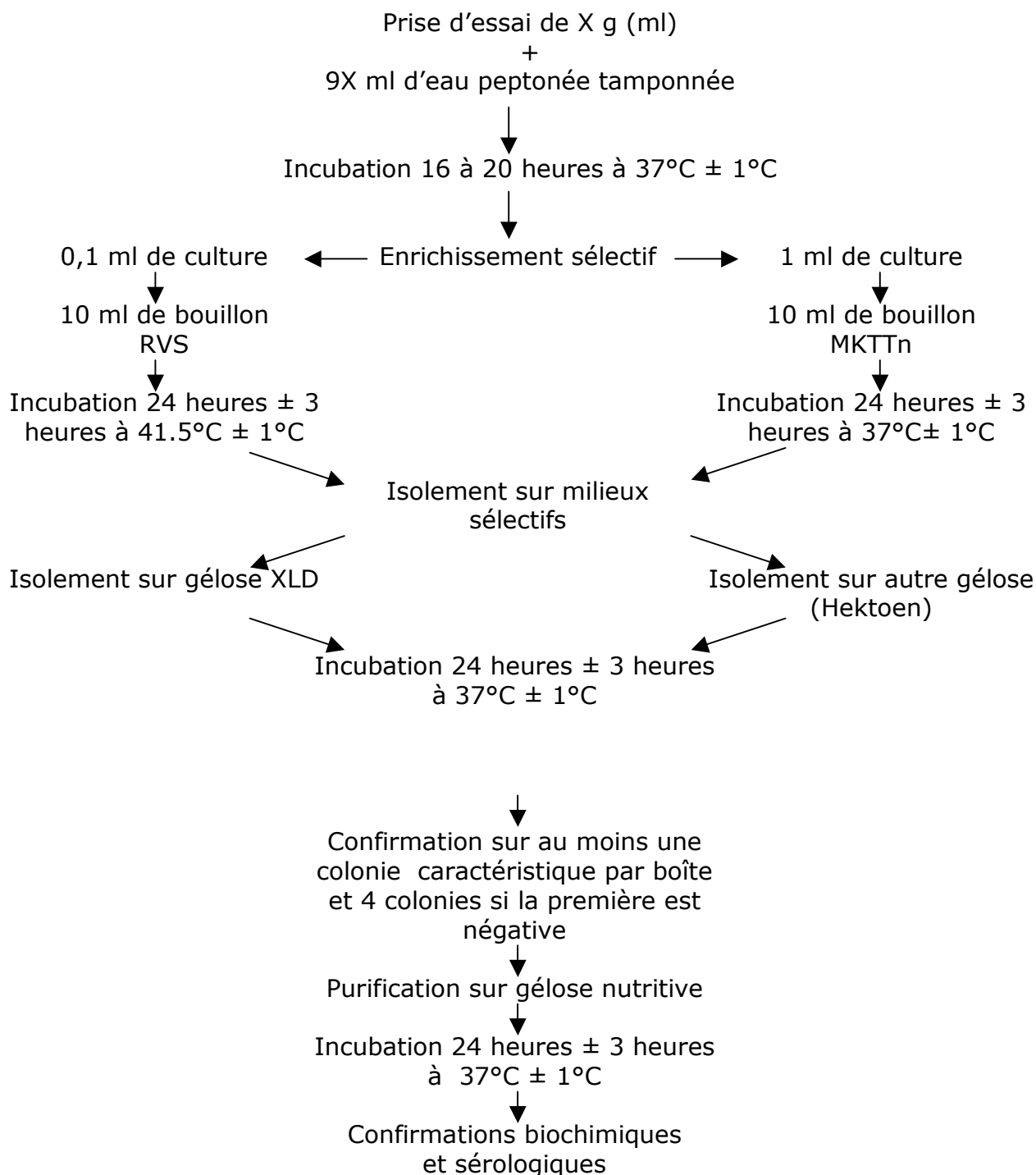
L'exactitude obtenue est de 99%, la sensibilité relative de 98% et la spécificité relative est de 99 %. 5 résultats discordants ont été obtenus : 1 résultat positif supplémentaire et 4 résultats faux négatifs.

Le niveau de détection relatif de la méthode alternative et de la méthode de référence a été évalué pour 6 catégories de produits. Les résultats sont comparables puisque la limite de détection de la méthode alternative varie de 0,3 à 1,4 CFU /25 mL (g) et celle de la méthode de référence varie de 0,4 à 1,3 CFU /25 mL (g) pour l'ensemble des catégories.

Concernant la sélectivité de la méthode alternative, les résultats montrent une bonne sélectivité avec quelques réactions croisées observées avec des souches appartenant au genre *Citrobacter*.

Les résultats obtenus pour les 12 laboratoires collaborateurs retenus montrent que les valeurs de l'exactitude relative, de la sensibilité relative et de la spécificité relative obtenues suite à l'étude collaborative sont comparables à celles obtenues lors de l'étude préliminaire. La variabilité de la méthode alternative, mise en évidence par les calculs du degré d'accord, de la concordance et des *odds ratio*, est similaire à celle de la méthode de référence.

Protocole de la méthode de référence NF EN ISO 6579



Sélectivité - Souches non cibles

Souches	Origine	Code	CFU/mL	Test Ridascreen <i>Salmonella</i>		
				L.V.	DO _{450nm}	Résultat du test
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Sandwich(dinde-fromage)	I5	7,10E+05	-	0,066	Négatif
<i>Bacillus cereus</i>	Lait UHT	I80	7,80E+05	-	0,074	Négatif
<i>Citrobacter diversus</i>	CIP 82.87 T	R124	3,20E+05	-	0,084	Négatif
<i>Citrobacter freundii</i>	CIP 5362	R35	3,80E+05	+	0,230	Positif
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	R40	1,80E+05	+	0,209	Positif
<i>Citrobacter koserii</i>	CIP 7211	R2	3,40E+05	-	0,160	Négatif
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Ind. laitière	I25	2,10E+05	-	0,083	Négatif
<i>Enterobacter cloacae</i>	CIP 60.86 T	R8	3,30E+05	-	0,104	Négatif
<i>Enterobacter faecalis</i>	ATCC 7211	R7	1,40E+05	-	0,090	Négatif
<i>Enterobacter faecalis</i>	CIP 103214	R84	2,70E+05	-	0,075	Négatif
<i>Enterobacter sakazakii</i>	CIP 57.33	R115	2,90E+05	-	0,106	Négatif
<i>Enterobacter sakazakii</i>	CIP 103581	R116	3,10E+05	-	0,090	Négatif
<i>Enterococcus hirae</i>	CIP 58.55	R5	2,10E+05	-	0,082	Négatif
<i>Escherichia coli</i>	Carottes râpées	I2	3,60E+05	-	0,078	Négatif
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	R74	4,80E+05	-	0,111	Négatif
<i>Escherichia coli</i>	Ind. laitière	I23	4,30E+05	-	0,091	Négatif
<i>Escherichia hermanii</i>	CIP 103176	R82	6,90E+05	-	0,142	Négatif
<i>Escherichia vulneris</i>	ADRIA 132	I86	5,40E+05	-	0,059	Négatif
<i>Escherichia vulneris</i>	CIP 103177T	R119	2,40E+05	-	0,108	Négatif
<i>Hafnia alvei</i>	CNRZ 73	R14	3,70E+05	-	0,104	Négatif
<i>Hafnia alvei</i>	Taboulé	I3	2,50E+05	-	0,112	Négatif
<i>Hafnia alvei</i>	Jaune d'œuf	I89	6,10E+05	-	0,062	Négatif
<i>Klebsiella oxytaca</i>	Salade soja	I17	4,20E+05	-	0,080	Négatif
<i>Klebsiella ozanae</i>	Peau de cou de poulet	Kle 4.1	3,00E+05	-	0,026	Négatif
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pâtisserie	I6	3,00E+05	-	0,060	Négatif
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CIP 8291	R60	8,90E+05	-	0,081	Négatif
<i>Micrococcus luteus</i>	Industrie laitière	I30	3,90E+05	-	0,110	Négatif
<i>Pantoea agglomerans</i>	ADRIA 78	I84	5,00E+05	-	0,074	Négatif
<i>Pantoea agglomerans</i>	CIP 57.51T	R122	9,90E+04	-	0,063	Négatif
<i>Proteus mirabilis</i>	CIP 103181	R95	4,00E+05	-	0,076	Négatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Omelette gruyère	I16	8,70E+04	-	0,060	Négatif
<i>Serratia ficaria</i>	CIP 79.23	R117	2,10E+05	-	0,063	Négatif
<i>Serratia fonticola</i>	CIP 103580	R118	1,20E+05	-	0,070	Négatif

Sélectivité - souches cibles (1/2)

Souches	Origine	Code	Concentration (CFU/225mL)	Test Ridascreeen <i>Salmonella</i>		
				L.V.	DO _{450nm}	Résultat
S. Agona	Industrie laitière	I 26	61	+	0,542	Pos.
S. Anatum	Saucisson sec	S23	48	+	0,973	Pos.
S. Anatum	Sésame décortiqué	S78	37	+	2,680	Pos.
S. Brandenburg	Côte de porc	S 1	52	+	0,336	Pos.
S. Brandenburg	Gratin de courgette	S 2	54	+	0,329	Pos.
S. Brandenburg	Viande cuite	S 3	14	+	0,305	Pos.
S. Cerro	Farine de lapin	S198	91	+	0,638	Pos.
S. Colindale	Basilic	S77	16	+	>3,50	Pos.
S. Derby	Echine de porc	S 9	85	+	0,597	Pos.
S. Derby	Porc	S21	31	+	0,513	Pos.
S. Diarizonae	Semoule de blé	17499	152	+	>3,50	Pos.
S. Diarizonae	Semoule de blé	17483	42	+	0,322	Pos.
S. Dublin	Lait	S59	83	+	0,663	Pos.
S. Enteritidis	Poulet	S11	78	+	0,466	Pos.
S. Enteritidis	Ovoproduit	S38	120	+	1,494	Pos.
S. Enteritidis	Viande rouge	S56	8	+	1,236	Pos.
S. Gallinarum	CIP 56.8	R108	24	+	0,996	Pos.
S. Gallinarum	CIP A 255	R111	60	+	2,024	Pos.
S. Hadar	Merguez	S22	45	+	0,346	Pos.
S. Heidelberg	Viande de volaille	S51	92	+	0,697	Pos.
S. Indiana	Filet de bœuf	S55	25	+	0,971	Pos.
S. Infantis	CIP 103549	R 32	57	+	2,232	Pos.
S. Infantis	ATCC 51741	R100	68	+	2,548	Pos.
S. Infantis	NEOGEN C1.794	R102	84	+	0,530	Pos.
S. Infantis	Farine de viande	S64	39	+	>3,50	Pos.
S. Livingstone	Envt-atelier de production	S209	92	+	>3,50	Pos.
S. London	Escargot de mer	S70	48	+	2,823	Pos.
S. Mikawasima	Salade de fruits frais	S80	40	+	>3,50	Pos.
S. Montevideo	Tartare pur bœuf	S75	40	+	>3,50	Pos.
S. Muenchen	Envt-atelier de production	S224	114	+	1,042	Pos.
S. Ohio	Envt-atelier de production	S225	38	+	>3,50	Pos.
S. Orion	Canard	S74	38	+	1,696	Pos.
S. Paratyphi A	CIP 55 39	R105	19	+	1,497	Pos.
S. Paratyphi A	CIP 55.40	R107	340	+	2,472	Pos.
S. Paratyphi A	CIP A 220	R109	12	+	0,354	Pos.
S. Paratyphi A	CIP 55.41	R112	32	+	1,548	Pos.
S. Paratyphi B	CIP 54 100	R103	21	+	0,442	Pos.
S. Paratyphi B	Filet de poulet cru	S76	48	+	2,674	Pos.
S. Paratyphi C	CIP 55.108	R106	100	+	0,390	Pos.
S. Plymouth	Envt-atelier de production	S214	84	+	>3,50	Pos.
S. Rissen	Envt-atelier de production	S234	54	+	>3,50	Pos.

Sélectivité - souches cibles (2/2)

Souches	Origine	Code	Concentration (CFU/225mL)	Test Ridascreen <i>Salmonella</i>		
				L.V.	D0 _{450nm}	Résultat
S. Bredeney	Rôti de dinde cru	S10	33	+	2,881	Pos.
S. Kaneshie	Produits végétaux	S72	59	+	0,257	Pos.
S. Dugbe	Produits végétaux	S71	39	+	0,400	Pos.
S. Hadar	Escalope de volaille	S7	70	+	1,198	Pos.
S. Hadar	Poulet cru	S12	51	+	1,030	Pos.
S. Kottbus	Jardinière	S13	51	+	1,436	Pos.
S. Kottbus	Sauté de dinde cru	S14	50	+	1,304	Pos.
S. Virchow	11337 (intox)	S53	82	+	>3,50	Pos.
S. Infantis	Farine de viande	S64	50	+	>3,50	Pos.
S. Heidelberg	/	Sal 8.1	39	+	3,403	Pos.
S. Kedougou	Farine de viande	Sal 3	97	+	0,378	Pos.
S. Arizonae (S.IIIb 61:k:1,5,7)	Chocolaterie	S81	66	+	0,332	Pos.
S. Diarizonae (16:z10: e,n,x,z15)	Boue station épuration	2414	69	+	0,235	Pos.
S. Arizonae (S.IIIa 48:z4,z23 : -)	Canard	2255	87	+	0,371	Pos.
S. Arizonae (S.IIIb 47: i , z53)	Canard	2028	93	+	0,233	Pos.
S. Kedougou	Couenne de porc	8430.07	105	+	0,522	Pos.
S. Kedougou	Envt atelier	8715.07	74	+	0,797	Pos.
S. Kedougou	Usine de chocolat	8616.07	106	+	>3,50	Pos.
S. Saint-Paul	Filet de dinde cru	S 6	61	+	0,311	Pos.
S. Saint-Paul	Rôti de lapin	S24	27	+	>3,50	Pos.
S. Schwarzengrund	Sauté de porc cru	S 8	140	+	0,605	Pos.
S. Schwarzengrund	Farine de viande	S69	44	+	2,000	Pos.
S. Senftenberg	CIP 105343	R 36	39	+	0,510	Pos.
S. Tennessee	Envt-atelier de production	S216	87	+	>3,50	Pos.
S. Typhi	CIP 54 136	R104	40	+	0,442	Pos.
S. Typhimurium	Bœuf haché cru	S15	30	+	0,891	Pos.
S. Typhimurium	Pieds en gelée	S18	59	+	0,464	Pos.
S. Typhimurium	Pigeon	S20	34	+	0,657	Pos.
S. Typhimurium	CIP 60.62	R 69	23	+	0,682	Pos.
S. Typhimurium	Pièce de porc	S28	68	+	0,366	Pos.
S. Virchow	CIP 105355	R 33	28	+	0,652	Pos.
S. Virchow	6838 (lact +)	S54	76	+	0,391	Pos.
S. Virchow	11337 (intox)	S53	49	+	>3,50	Pos.
S. Worthington	Envt-atelier de production	S232	60	+	0,285	Pos.