



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

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

N° attestation : SDI 34/01 – 04/10

Date de validation : 02.04.2010

Fin de validité : 02.04.2014

La société
(siège social et
site de production)

SDIX
111 Pencader Drive
Newark, DE 19702 USA

Distributeur

SDIX Europe Ltd.
Barnes Wallis House
25 Barnes Wallis Road
Segensworth East
Hampshire, PO15 5TT UK

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

RapidChek® SELECT Salmonella
Part Numbers 7000190-7000197

Référence du protocole : Part Number 3090045 - V.4

DOMAINE D'APPLICATION

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

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

La méthode ne permet pas la détection des *Salmonella* appartenant au groupe « O : 18 » (K pour l'ancienne désignation).

METHODE DE REFERENCE

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

Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode RapidChek SELECT *Salmonella* est un test immunologique basé sur une réaction de type sandwich permettant de détecter la présence de *Salmonella* après 24 heures d'incubation.

Un anticorps spécifique de *Salmonella* est immobilisé sur une ligne de test sur une bandelette. Un second anticorps également spécifique de *Salmonella* et marqué à l'or colloïdal est contenu dans un pad en amont du champ de lecture. Lors de la migration de l'échantillon par capillarité dans la bandelette, le complexe « anticorps-or colloïdal » capte spécifiquement les *Salmonella* et est entraîné avec l'échantillon liquide vers la ligne test. Les anticorps anti-*Salmonella* immobilisés sur la ligne de test forment un complexe « *Salmonella*-anticorps-or colloïdal » entraînant l'apparition d'une coloration rouge sur la ligne de test. Les réactifs immobilisés sur la ligne témoin capturent le complexe anticorps-or-colloïdal en excès. Deux lignes rouges indiquent un échantillon positif et une seule ligne un échantillon négatif.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode alternative doivent être confirmés selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification), à partir du second milieu d'enrichissement RapidChek SELECT et isolement sur deux géloses sélectives XLD et ASAP.

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé les tests décrits ci-dessus), le laboratoire devra mettre en oeuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

EXACTITUDE relative, SPECIFICITE relative, SENSIBILITE relative

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

Des essais ont été effectués en 2009 sur 380 échantillons de produits dont 50 naturellement contaminés, 136 artificiellement contaminés et 194 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, produits laitiers, végétaux et produits de la mer, ovoproduits, alimentation animale et prélèvements d'environnement.

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

Tableau de résultats (Cf. tableau 1 de la norme NF EN ISO 16140) :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 168 ⁽¹⁾	Déviation positive A+ / R- PD = 6 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviation négative A- / R+ ND = 12 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 194 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

(3) dont 22 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

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

- Exactitude relative : **AC = 95,3%**
- Spécificité relative : **SP = 97,0%**

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

- Sensibilité relative : **SE = 93,3%**

La **sensibilité** a également été recalculée en tenant compte de l'ensemble des positifs confirmés (ceci inclut les positifs supplémentaires de la méthode alternative) :

Méthode alternative :	Méthode de référence :
$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 93,5\%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 96,8\%$

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

$PD = 6$, $ND = 12$, $Y = PD + ND = 18$; $6 \leq Y \leq 22$, $m = 6$, $M = 4$, donc $m > M$

Conclusion

Les méthodes ne sont pas différentes en terme statistique.

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2009, sur les 6 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : Produits carnés, produits laitiers, végétaux et produits de la mer, ovoproduits, alimentation animale et prélèvements d'environnement.

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

Les résultats obtenus sont les suivants :

Matrice	Souche	Niveau de détection relatif LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Viande hachée	S. Typhimurium	1,2 [0,9 – 1,5]	0,9 [0,7 – 1,1]
Lait cru	S. Newport	0,7 [0,5 – 0,9]	0,6 [0,4 – 0,8]
Poisson frais	S. London	0,9 [0,7 – 1,2]	0,7 [0,6 – 0,8]
Oeuf	S. Enteritidis	0,7 [0,5 – 1,1]	0,6 [0,4 – 0,9]
Aliment pour chat	S. Infantis	1,3 [0,8 – 2,2]	0,9 [0,6 – 1,4]
Eau de process	S. Mbandaka	0,8 [0,6 – 1,2]	0,9 [0,6 – 1,1]

(3) LOD₅₀ : estimation du niveau de contamination qui permet d'obtenir une détection positive par la méthode alternative dans 50% des cas. FDA. 2006. *Final Report and Executive Summaries from the AOAC International Presidential Task Force on Best Practices in Microbiological Methodology. Appendix K. Statistics Working Group (Tholen, D. W., D. S. Paulson, B. Jarvis, D. M. Mettler, B. Lombard, K. Newton, M. A. Mozola, and A. D. Hitchins.) Report Part 4a - LOD50.*

Conclusion

Le niveau de détection de la méthode alternative se situe entre 0,5 et 2,2 UFC/25 g.
Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,4 et 1,4 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- 43 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 51 testées. Cinq souches ne se sont pas développées sur le « RapidChek Primary medium » (S. Derby, S. Gallinarum, S. Havana, S. Paratyphi C and S. Typhimurium) et trois autres souches ont donné un résultat négatif par la méthode alternative.
- Des essais complémentaires ont été réalisés sur quatre souches de *Salmonella* appartenant au groupe O :18 (S. Carnac, S. Toulon et deux S. Cerro). Tous les résultats ont été négatifs par la méthode alternative, et positifs par la méthode de référence.
- L'étude de 30 souches non *Salmonella* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées.

PRATICABILITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
- L'obtention des résultats **positifs** se fait en 3 à 4 jours avec la méthode alternative contre 4 à 5 jours avec la méthode de référence.
- L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 1 jour avec la méthode alternative contre 3 jours avec la méthode de référence.
- Dans le cas de résultats présumés positifs par la méthode alternative, mais rendus négatifs après confirmation, les résultats négatifs sont obtenus en 4 jours.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2010 avec 14 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Salmonella* Enteritidis aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC / 25 mL
- 3 UFC / 25 mL
- 30 UFC / 25 mL

Les laboratoires ont testé, par les **deux méthodes**, **8 réplicats** pour chaque niveau de contamination, soient 24 analyses au total par laboratoire participant.

Résultats :

Niveaux de contamination	Nombre total d'échantillons	Nombre d'échantillons analysés*	Nombre de résultats exploités**	Nombre de résultats négatifs		Nombre de résultats positifs	
				REF	ALT	REF	ALT
1	128	96	88	88	88	0	0
2	128	96	88	0	0	88	88
3	128	96	88	0	0	88	88

* Deux laboratoires n'ayant pas reçu les échantillons n'ont pas réalisé les essais.

** Les résultats d'un laboratoire n'ont pas été pris en compte, le protocole de la méthode alternative n'ayant pas été correctement mis en œuvre.

Calculs

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

La **sensibilité** a également été recalculée en tenant compte de l'ensemble des positifs confirmés (ceci inclut les positifs supplémentaires de la méthode alternative) :

Méthode alternative :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 100\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 100\%$$

Degré d'accord, concordance et odds ratio :

Degré d'accord : % de chance de trouver le même résultat pour deux échantillons identiques analysés par le même laboratoire dans des conditions de répétabilité. C'est la moyenne des probabilités que deux réplicats donnent le même résultat pour chaque laboratoire.

Concordance : % de chance de trouver le résultat pour deux échantillons identiques analysés dans deux laboratoires différents (conditions de reproductibilité). C'est le % de toutes les paires de réplicats donnant le même résultat.

Odds ratio (COR) : il est défini par la formule suivante :

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

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

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

Conclusion

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

Il est souhaitable d'adresser à AFNOR Certification toute réclamation concernant les performances de la méthode validée

Vous trouverez le document de synthèse des études préliminaire et interlaboratoire sur le site www.afnor-validation.org