



**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 : UNI 03/01-05/91

Date de validation :	30.05.1991
Dates de reconduction :	08.09.1995
	07.09.1999
	11.12.2003
	04.12.2007*
	01.07.2011
Fin de validité :	07.09.2015

* Le protocole NF EN ISO 16140 a été mis en œuvre en 2007 lors de la 4^{ème} reconduction

La Société
(siège social et
site de production)

OXOID Ltd
Wade Road
Basingstoke
Hampshire, RG24 8 PW
England, UK

Représentée par **OXOID Thermo Fisher Scientific**
6 route de Paisy
69571 Dardilly cedex
France

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

OXOID SALMONELLA RAPID TEST (OSRT)

Référence du protocole (provisoire) : 12/2007

DOMAINE D'APPLICATION : Produits d'alimentation humaine et animale, et prélèvements d'environnement (excepté l'environnement de production primaire).

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI : La méthode est destinée à la détection des salmonelles mobiles et n'est pas adaptée à la détection des *Salmonella* immobiles (souches immobiles ou ayant perdu leur mobilité).

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

**Directrice Générale
Florence MÉAUX**



AFNOR Certification

11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France
Tél +33 (0)1 41 62 80 00 – Fax +33 (0)1 49 17 90 00
www.afnor.org - www.afnor-validation.org

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode Oxoid *Salmonella* Rapid Test (OSRT) consiste en un préenrichissement d'un échantillon homogénéisé dans un milieu adapté, suivi d'une inoculation dans un milieu spécial « *Salmonella* ». Les « *Salmonella* » migrent activement à partir d'un milieu sélectif inférieur vers un milieu indicateur supérieur qui change alors de couleur.

Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue du test OSRT doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

- En partant du milieu indicateur positif, selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO à partir de colonies (en incluant l'étape de purification)
- en réalisant un test au latex OSLT à partir du tube présentant une réaction positive. La réaction d'agglutination de particules de latex met en évidence la présence d'antigènes somatiques et flagellaires de *Salmonella*
- En mettant en œuvre toute autre méthode certifiée NF VALIDATION, de principe différent de celui de la méthode OSRT. 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 (OSRT utilisée en détection et l'autre en confirmation) doivent donc avoir un tronc commun.

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé par l'une des options décrites ci-dessus, en particulier par le test Latex), le laboratoire devra mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

NOTE (Historique de validation)

Dans le cadre de l'étude de reconduction de 2007, la quasi-totalité de l'étude de validation a été refaite car le référentiel de validation a été modifié, la norme EN ISO 16140 étant désormais applicable. Seules quelques données acquises en 2003 ont été conservées et réinterprétées (exactitude, étude comparative). L'étude interlaboratoire a été refaite. Lors de cette étude, le domaine d'application de la méthode OSRT a été étendu aux prélèvements de l'environnement, le test de confirmation OSLT a été validé, ainsi que la possibilité de conserver les préenrichissements pendant 72 heures à 2-8°C.

En juillet 2011, la validation de la méthode OSRT a été reconduite. La méthode n'a pas été modifiée depuis la dernière validation, et le protocole de validation EN ISO 16140 ainsi que la méthode de référence n'ont pas changé. L'étude de sélectivité a été complétée selon les exigences particulières NF VALIDATION. Les résultats conformes à ceux attendus ne sont pas repris dans l'attestation.

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 2003 et en 2007, au total sur 447 échantillons de produits dont 123 naturellement contaminés, 96 artificiellement contaminés et 228 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

- produits laitiers,
- produits carnés,
- produits végétaux, produits de la mer et divers,
- ovoproduits,
- aliments pour animaux,
- 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 = 207 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 9 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 3 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 228 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont aucun échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

(3) dont 8 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 = 97,3%**
- Spécificité relative : **SP = 96,2%**
- Sensibilité relative : **SE = 98,6%**

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

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 :
$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 98,6\%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 95,9\%$

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

PD = 9 , ND = 3 donc Y = PD + ND = 12 ; $6 \leq Y \leq 22$ m = 3, M = 2 donc m > M

Conclusion

Les deux méthodes ne sont pas différentes en termes statistiques.

Essais de conservation de l'eau peptonée tamponnée pendant 72 heures à 4°C

Des essais de conservation de l'EPT, pendant 72 heures à 4°C, ont été effectués sur des échantillons analysés en 2007 (échantillons ayant donné un résultat positif directement après incubation et échantillons discordants).

Sur 107 échantillons ayant donné un résultat positif directement après incubation, 3 échantillons ont donné un résultat négatif après conservation de l'EPT 72h à 4°C. Il s'agit d'échantillons qui étaient positifs supplémentaires à la première analyse.

Deux échantillons ayant donné des résultats discordants à la première analyse (déviations négatives) sont devenus concordants après conservation de l'EPT 72 h à 4°C.

Le stockage au froid ne modifie pas sensiblement les résultats obtenus immédiatement après incubation.

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2007, sur les 6 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : Produits laitiers, produits carnés, produits végétaux, produits de la pêche, aliments pour animaux, prélèvements d'environnement.

- produits laitiers,
- produits carnés,
- produits végétaux, produits de la mer et divers,
- ovoproduits,
- aliments pour animaux,
- 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
Steak haché	<i>Salmonella</i> Infantis	0,3 [0,1 – 0,8]	0,3 [0,1 – 0,8]
Lait cru	<i>Salmonella</i> Typhimurium	0,3 [0,1 – 1,0]	0,3 [0,1 – 0,9]
Filet de cabillaud	<i>Salmonella</i> Saintpaul	0,8 [0,5 – 1,3]	0,8 [0,5 – 1,3]
Coule d'oeuf	<i>Salmonella</i> Enteritidis	0,2 [0,1 – 0,8]	0,3 [0,1 – 1,0]
Boulettes pour chat	<i>Salmonella</i> Agona	0,6 [0,3 – 1,8]	0,6 [0,3 – 1,8]
Eau de process	<i>Salmonella</i> Derby	0,3 [0,1 – 1,1]	0,3 [0,1 – 1,1]

(3) LOD₅₀ : estimation du niveau de contamination qui permet d'obtenir une détection positive par la méthode alternative dans 50% des cas

"Hitchins A. Proposed Use of a 50% Limit of detection Value in Defining Uncertainty Limits in the Validation of Presence-Absence Microbial detection Methods, Draft 10th December, 2003"

Conclusion

Le niveau de détection de la méthode alternative et celui de la méthode de référence sont équivalents et se situent entre 0,1 et 1,8 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- 52 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 55 testées (réaction positive en kit OSRT et test latex positif). Les 3 souches qui ne se sont pas développées sur le kit OSRT sont des *Salmonella* Paratyphi A. Ces 3 souches ont donné une réaction positive au latex et des colonies caractéristiques sur gélose OSCM II. Les colonies sur gélose XLD sont non caractéristiques.
- 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 2 jours (si confirmation latex) ou 5 jours (si confirmation classique) avec la méthode alternative contre 5 jours avec la méthode de référence.
- L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours 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 2 à 5 jours selon le mode de confirmation.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2007 avec 13 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé demi-écrémé, contaminés artificiellement avec une souche de *Salmonella* Typhimurium aux 3 niveaux suivants :

- niveau 0 : 0 UFC/25 ml
- niveau 1 : 1-10 UFC/25 ml
- niveau 2 : 5-50 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
0	104	104	88	88	88	0	0
1	104	104	88	0	0	88	88
2	104	104	88	0	0	88	88

* Deux laboratoires ont trouvé des échantillons non inoculés positifs. Une intercontamination a été suspectée et leurs résultats n'ont pas été exploités.

Calculs

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

Interprétation

Les résultats de l'étude collaborative sont comparables à ceux obtenus lors de l'étude préliminaire.

Degré d'accord, concordance et odds ratio :

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

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

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

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

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