



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

N° attestation : TRA 02/8 – 03/01

Date de validation : 23.03.2001

Date de reconduction* : 03.02.2005

Fin de validité : 03.02.2009

* reconduction selon le protocole NF EN ISO 16140

La Société **DIFFCHAMB S.A.**
(siège social et 8, rue saint Jean de Dieu
site de production) 69007 LYON

Distributeur **DIFFCHAMB FRANCE SARL**
85, Bd du Parc d'Artillerie
69007 LYON

est autorisée à faire référence à cette **attestation de Validation AFNOR** pour la méthode alternative qualitative d'analyse ci-dessous :

TRANSIA™ PLATE *Salmonella* GOLD
Réf SA 0180 (1 microplaque) et Réf SA 0190 (10 microplaques)

Référence du protocole : **NOT COM 510J** 02/06 (SA 0180) et **NOT COM 710K** 02/06 (SA 0190)

PRINCIPE DE LA METHODE

TRANSIA™ PLATE *Salmonella* GOLD est un test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) basé sur une réaction de type sandwich en trois étapes. La procédure d'enrichissement s'effectue en deux étapes, avec un pré-enrichissement en eau peptonée tamponnée, suivi d'un enrichissement sélectif en milieu Rappaport Vassiliadis Soja. Le support solide de la réaction est une plaque de microtitration à barrettes sécables, dont les puits sont greffés avec des anticorps spécifiques du genre *Salmonella*. La lecture de la microplaque se fait avec un spectrophotomètre à une DO de 450 nm.

Dans le cadre de la Validation AFNOR, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode TRANSIA PLATE *Salmonella* GOLD doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

- selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN, l'ISO ou l'AFNOR (en incluant l'étape de purification), en réalisant au préalable l'isolement sur deux géloses sélectives différentes à partir du milieu sélectif utilisé pour l'enrichissement (RVS)
- avec une autre méthode validée AFNOR de principe différent de la méthode TRANSIA™ PLATE *Salmonella* GOLD, en suivant les instructions décrites dans la notice du fabricant.

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé par les tests décrits dans les méthodes normalisées par le CEN, l'ISO ou l'AFNOR, ou par une autre méthode validée AFNOR), le laboratoire devra mettre en oeuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine ou animale, et prélèvements de l'environnement.

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI : Aucune

METHODE DE REFERENCE

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

**Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN**

NOTE

La méthode TRANSIA™ PLATE *Salmonella* GOLD a été validée en 2001 selon l'ancien protocole, en comparaison à la norme EN 12824, pour tous produits d'alimentation humaine et animale.

La reconduction en 2005 a été réalisée selon le protocole décrit dans la norme EN ISO 16140 (2003), en comparaison à la nouvelle méthode de référence EN ISO 6579 (2002). En outre, des modifications ont été apportées au protocole de la méthode alternative (réalisation des tests à partir du bouillon RVS juste après incubation et choc thermique ou après conservation des bouillons RVS à 3°C ± 2°C jusqu'à 48h et choc thermique) et la validation a été étendue aux prélèvements d'environnement.

L'étude préliminaire et l'étude collaborative ont été refaites complètement selon le protocole EN ISO 16140. En outre, tous les échantillons positifs (artificiellement et naturellement contaminés) ainsi que les échantillons douteux, ont été retestés après 48h de conservation du bouillon RVS à 3°C ± 2°, pour valider la possibilité de réalisation des tests après conservation des bouillons au froid jusqu'à 48h.

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 2004 sur 429 échantillons de produits dont 69 naturellement contaminés, 118 artificiellement contaminés et 242 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

- Produits carnés
- Produits laitiers
- Produits végétaux et produits de la pêche
- Divers (ovoproduits, plats cuisinés, pâtisseries)
- Alimentation animale
- 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 = 186 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 0 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 1 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 242 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

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

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

- Exactitude relative : **99,8%**
- Spécificité relative : **100%**
- Sensibilité relative : **99,5%**

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 99,5\%$$

Méthode de référence :

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

Conclusion

Les performances de la méthode TRANSIA™ PLATE *Salmonella* GOLD apparaissent équivalentes à celles de la méthode de référence.

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2004, 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
- Produits végétaux et produits de la pêche
- Divers (ovoproduits, plats cuisinés, pâtisseries)
- Alimentation animale
- Environnement

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

Les résultats obtenus sont les suivants :

		Niveau de détection relatif LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
Matrice	Souche	Méthode alternative	Méthode de référence
Viande hachée de volaille	<i>Salmonella</i> Hadar	0,3 [0,2 – 0,5]	0,3 [0,2 – 0,5]
Lait cru	<i>Salmonella</i> Typhimurium	0,8 [0,4 – 1,4]	0,8 [0,4 – 1,4]
Coule d'œufs	<i>Salmonella</i> Enteritidis	0,7 [0,4 - 1,3]	0,7 [0,4 - 1,3]
Filet d'églefin	<i>Salmonella</i> Virchow	0,3 [0,2 – 0,5]	0,3 [0,2 – 0,5]
Aliments pour animaux	<i>Salmonella</i> Senftenberg	0,5 [0,3 – 0,9]	0,5 [0,3 – 0,9]
Eau de process	<i>Salmonella</i> Infantis	0,7 [0,4 – 1,5]	0,7 [0,4 – 1,5]

(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 se situe entre 0,2 et 1,5 UFC/25 g. Il est identique à celui de la méthode de référence

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 50 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 30 souches non *Salmonella* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**

- L'obtention des résultats **positifs** se fait en 5 à 7 jours avec la méthode alternative (en incluant la purification et les tests classiques de la méthode de référence), comme pour la méthode de référence.
- L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours avec la méthode alternative contre 3 à 7 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 3 à 7 jours

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2004 avec 11 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de *Salmonella* Typhimurium aux 3 niveaux suivants :

- niveau 0
- niveau légèrement supérieur au niveau de détection relatif (3 cellules / 25ml)
- niveau 10 fois supérieur au niveau précédent (30 cellules / 25ml)

Les laboratoires ont testé, par les **deux méthodes, 8 réplicats** pour **chaque niveau** de contamination, soit 260 analyses au total pour l'ensemble des laboratoires collaborateurs.

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	88	80	80	80	0	0	
1	88	80	80	4	5	76	75
2	88	80	80	0	0	80	80

** un laboratoire n'a pas reçu les échantillons dans le délai prévu et n'a pas réalisé les analyses*

Calculs

- L'exactitude relative est de **99,6%**
- le % de spécificité est de **100%**
- le % de sensibilité est de **96,9%**

Interprétation

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

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 99,4\%$$

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** :

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1,00
L1	91%	87,7%	1,04
L2	100%	100%	1,00

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1,00
L1	93%	90,1%	1,03
L2	100%	100%	1,00

Conclusion

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

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

AFAQ AFNOR CERTIFICATION tient à votre disposition un document de synthèse des études préliminaire et collaborative