

OXOID THERMOFISCHER SCIENTIFIC

6 route de Paisy

69571 Dardilly Cedex

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

Rapport de synthèse

**Etude de reconduction
de la validation de la méthode
BAX[®] System PCR Assay *Salmonella* spp.**

Méthode qualitative

Ce rapport comprend 39 pages dont 2 annexes.

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

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

Version 0
28 septembre 2010

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>

ASSOCIATION LOI DE 1901 - N° SIRET 306 964 271 00036 - N° EXISTENCE 532900006329 - N°TVA FR4530696427100036

Sommaire

1	Rappel sur la méthode alternative	4
1.1	Date de la première validation et date de reconduction	4
1.2	Protocole et principe de la méthode alternative	4
1.2.1	Principe de la méthode BAX [®] Salmonella	4
1.2.1	Protocoles de la méthode BAX [®] Salmonella	5
1.3	Méthode de référence à laquelle la méthode alternative a été comparée	6
1.4	Historique de la validation et principaux résultats obtenus	7
1.4.1	Etude comparative des méthodes (réalisée par l'Institut Pasteur de Lille) : protocole tout produit à l'exception des viandes crues	7
1.4.2	Extension de validation à l'analyse des viandes crues avec un enrichissement en 24 h en bouillon MP (réalisée par ADRIA Développement)	14
1.4.3	Extension de validation à l'analyse des viandes crues de bœuf avec un enrichissement entre 9 h et 24 h en bouillon MP (réalisée par ADRIA Développement)	19
1.4.4	Etude interlaboratoire (réalisée par l'Institut Pasteur de Lille)	25
1.4.5	Praticabilité	32
1.4.6	Conclusion	35
1.5	Bilan des modifications intervenues dans la méthode alternative, ayant donné lieu ou non à une extension de validation	36
2	Etude bibliographique	36
<input type="checkbox"/>	Annexe 1 - Méthode alternative	38
<input type="checkbox"/>	Annexe 2 - Méthode de référence NF EN ISO 6579 : 2002 : Microbiologie des aliments Méthode horizontale pour la recherche de Salmonella	39

Avant Propos

L'ensemble des renseignements permettant de valider la garantie des analyses est tenu à la disposition de la Société OXOID THERMOFISHER SCIENTIFIC.

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

- ✓ **Fabricant :** OXOID THERMOFISHER SCIENTIFIC
6 route de Paisy
69571 Dardilly Cedex

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

- ✓ **Méthode à valider :** BAX[®] System PCR Assay *Salmonella* spp.

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

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

- ✓ **Etendue de la validation :** Tous produits d'alimentation humaine et animale
Prélèvements d'environnement

♦ Essai effectué sous le couvert de l'accréditation
ADRIA Développement
(Synthèse – Version 0)

1 RAPPEL SUR LA METHODE ALTERNATIVE

1.1 Date de la première validation et date de reconduction

La méthode BAX[®] System PCR Assay *Salmonella* spp. a été validé le 28 novembre 2002 (n° attestation QUA 18/03-11/02). La méthode a été reconduite le 23 octobre 2006, avec trois extensions : 30 juin 2006, 27 novembre 2008 et 18 mai 2009. La validation expire le 28 novembre 2010.

1.2 Protocole et principe de la méthode alternative

Le protocole est donné en annexe 1.

1.2.1 Principe de la méthode BAX[®] Salmonella

Le système BAX[®] automatisé utilise la technologie PCR (Polymerase Chain Reaction).

Il permet d'obtenir des résultats négatifs en deux jours.

La réaction PCR amplifie un fragment d'ADN cible, spécifique de *Salmonella*. Les réactifs nécessaires à la réaction PCR et le contrôle interne sont inclus dans le même tube PCR (2 réactions en 1).

Le protocole de détection de *Salmonella* peut être divisé en 4 étapes :

- ❶ Pré-enrichissement et enrichissement,
- ❷ Lyse des cellules et libération de l'ADN,
- ❸ Amplification,
- ❹ Détection.

Le système BAX[®] automatisé est un automate composé d'un thermocycleur en temps réel. Les mesures de fluorescence sont analysées à l'aide du logiciel BAX[®] system.

1.2.1 Protocoles de la méthode BAX® Salmonella

Les protocoles validés sont les suivants :

- Préenrichissement et enrichissement

Pour tout produit, à l'exception des viandes et volailles crues	Pré-enrichissement : 16 à 20 heures à 37°C en Eau Peptonée Tamponnée (1/10), Puis subculture : 3 à 4 heures en BHI (10 µl EPT/500 µl BHI),
Pour les viandes et volailles crues (non assaisonnées)	Pré-enrichissement : 16 à 20 heures à 37°C en Eau Peptonée Tamponnée (1/10)
Pour les produits laitiers (sauf poudres de lait)	Pré-enrichissement : 20 à 24 heures à 42°C en Eau Peptonée Tamponnée (1/10), supplémentée en novobiocine à 20 mg/L
Pour les viandes crues	Pré-enrichissement en 24 h en bouillon MP à 42°C
Pour les viandes crues de bœuf	Enrichissement entre 9 h et 24 h en bouillon MP à 42°C

Des protocoles alternatifs sont proposés pour :

- * les produits laitiers,
- * les viandes et volailles crues,
- * les viandes crues,
- * les viandes crues de bœuf.

- Lyse des bactéries pour libérer l'ADN bactérien

- 5 µl de préenrichissement ou de subculture + 200 µl de tampon de lyse
- 20 minutes à 37°C (dégradation des protéines cellulaires),
- 10 minutes à 95°C (inactivation de la protéase)
- 5 minutes dans un bloc réfrigérant

- Amplification

- Transférer **50 µl** de **lysats** dans un tube PCR contenant (sous forme de comprimé) tous les réactifs nécessaires à la réaction PCR, au contrôle interne et à la réaction de fluorescence.

Les comprimés contiennent notamment :

- * *les nucléotides et la Taq polymérase*
 - * *l'amorce spécifique pour la détection de Salmonella spp.*
 - * *les amorces et l'ADN viral nécessaires au contrôle positif de la réaction PCR,*
 - * *de la BSA (bovine serum albumine) pour lever les inhibitions éventuelles de la réaction PCR par les composés polyphénoliques présents dans le cacao et autres produits alimentaires*
 - * *du SybrGreen™, marqueur utilisé pour la détection des produits d'amplification par fluorescence*
- Placer les tubes préparés dans le thermocycleur et lancer le programme d'amplification

- Détection

Les fragments d'ADN amplifiés génèrent un signal fluorescent qui est automatiquement détecté et analysé par le logiciel BAX® system.

- Confirmations des résultats positifs

Les résultats positifs sont confirmés par un isolement sur gélose sélective et une identification, à partir du bouillon de préenrichissement n'ayant pas subi l'étape de lyse.

En cas d'absence de colonie suspecte ou en cas de boîtes illisibles, un repiquage du bouillon de préenrichissement en bouillon RVS est réalisé.

Le bouillon RVS est incubé à 41,5°C pendant 24 heures, puis isolé sur géloses sélectives.

1.3 Méthode de référence à laquelle la méthode alternative a été comparée

La méthode de référence utilisée est la norme NF EN ISO 6579 (2002) : Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour la recherche de *Salmonella*. Le protocole est présenté en annexe 2.

1.4 Historique de la validation et principaux résultats obtenus

La méthode BAX[®] *Salmonella* est validée sous le numéro d'attestation QUA 18/03-11/02 :

- novembre 2002 : validation initiale selon le référentiel technique AFNOR,
- mars 2004 : extension de validation à un protocole spécifique pour les produits carnés crus,
- mars 2004 : extension de validation à un protocole spécifique pour les produits laitiers (hors poudres de lait)
- mai 2006 : extension de validation à un second automate (BAX[®] Q7),
- octobre 2006 : validation selon le référentiel ISO 16140.

Des modifications ont eu lieu depuis les précédentes études de reconduction et d'extension :

- simplification du protocole « produits laitiers (hors poudres de lait) : suppression de l'étape en bouillon BHI,
- extension avec évolution de la version du logiciel lié à l'automate Q7,
- extension de la validation à l'analyse des viandes crues en bouillon MP,
- extension de la validation à l'analyse des viandes crues de bœuf avec une étape de pré-enrichissement de 9 à 24h.

1.4.1 Etude comparative des méthodes (réalisée par l'Institut Pasteur de Lille) : protocole tout produit à l'exception des viandes crues

1.5.1.1. Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative

L'objectif de cette étude est de comparer les performances des deux méthodes :

- la méthode de référence NF EN ISO 6579,
 - la méthode BAX[®] *Salmonella* automatisée,
- sur des échantillons naturellement contaminés et non contaminés en *Salmonella*.

Selon la norme ISO 16140, un minimum de 60 produits par catégorie doit être analysé, avec environ 50% de produits positifs et 50% de produits négatifs.

Lors de l'étude de validation en 2002 et celle d'extension en 2004, des échantillons ont été analysés par les protocoles en vigueur.

Les produits artificiellement contaminés n'ont pas été pris en compte pour ce complément d'étude puisque les conditions de stress des souches contaminantes n'étaient pas les mêmes que celles exigées par la norme NF EN ISO 16140.

En revanche, la méthode de référence utilisée en 2002 étant celle actuellement en vigueur, les résultats de produits naturellement contaminés ou non contaminés analysés selon les protocoles en vigueur, obtenus sur le système BAX® ont été repris. Ces résultats ont été interprétés selon la norme NF EN ISO 16140.

Ces résultats ont été complétés pour atteindre les 60 résultats requis par catégorie.

☐ **Nombre et nature des échantillons**

Chaque catégorie a été divisée en différents types et les produits se répartissent de la manière suivante :

Catégories	Types	Positifs*		Négatifs		Total
		2002-2004	2006	2002-2004	2006	
Produits carnés	Viandes crues	27	0	15	0	42
	Volaille	5	0	13	0	18
	Charcuteries	7	0	14	0	21
	Total	39	0	42	0	81
Produits laitiers	Fromages au lait cru	0	9	16	3	28
	Fromages pasteurisés et glaces	0	13	6	0	19
	Laits et poudres de lait	2	8	8	0	18
	Total	2	30	30	3	65
Produits de la pêche Et végétaux	Poissons et crustacés	0	8	10	3	21
	Végétaux crus et épices	0	12	11	9	32
	Végétaux prêts à consommer	0	10	10	2	22
	Total	0	30	31	14	75
Divers	Ovoproduits	3	9	11	2	25
	Pâtisseries/chocolats	5	5	21	6	37
	Plats cuisinés	0	10	1	6	17
	Total	8	24	33	14	79
Alimentation animale	Tourteaux	0	8	4	11	23
	Farines/croquettes	3	2	9	4	21
	Viandes	1	13	1	6	21
	Total	4	26	14	21	65
Prélèvements d'environnement	Eaux de process	0	10	0	5	15
	Prélèvements de surface	0	12	0	14	26
	Résidus, déchets	0	8	0	11	19
	Total	0	30	0	30	60
TOTAL		53	140	150	82	425

* il s'agit des résultats positifs par l'une ou l'autre des méthodes

☐ Contamination artificielle des échantillons et pourcentage

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 de la validation AFNOR.

Elles concernent 110 échantillons et 95 ont donné un résultat positif. Au total, sur 193 résultats positifs, 49 % ont été obtenus suite à des contaminations artificielles.

☐ Résultats des essais

Les analyses ont été réalisées en simple par les deux méthodes. Les résultats obtenus pour les 425 échantillons analysés se répartissent de la manière suivante :

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)	Total
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 186	Déviations positives (R-/A+) PD = 1	187
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 6*	Accord négatif (A-/R-) NA = 232**	238
Total	192	233	425

Légende : A+ = positifs confirmés

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

* dont aucun résultat positif BAX[®] *Salmonella* positif non confirmé

** dont un résultat BAX[®] *Salmonella* positif, et non confirmé positif (résultat de 2002)

Les tableaux de résultats par catégories d'échantillons figurent ci-dessous :

Produits carnés (81)	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 = 2	Accord négatif (A-/R-) NA = 42

Produits laitiers (65)	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 = 1
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 0	Accord négatif (A-/R-) NA = 33

Produits de la pêche (21) et produits végétaux (54)	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 28	Déviations positives (R-/A+) PD = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 2	Accord négatif (A-/R-) NA = 45

Divers : ovoproduits, plats cuisinés, pâtisseries (79)	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 32	Déviations positives (R-/A+) PD = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 0	Accord négatif (A-/R-) NA = 47

Aliments pour animaux (65)	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 = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 1	Accord négatif (A-/R-) NA = 35

Prélèvements d'environnement (60)	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 = 0
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 1	Accord négatif (A-/R-) NA = 30

☐ **Calcul de l'exactitude relative, de la spécificité relative et de la sensibilité relative**

L'ensemble de ces résultats permet de calculer l'exactitude relative, la sensibilité relative et la spécificité relative pour chacune des catégories et pour l'ensemble des catégories, selon les formules de la norme NF EN ISO 16140.

Catégorie	PA	NA	ND	PD	Somme 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	37	42	2	0	81	97,5	39	94,9	42	100
Produits laitiers	31	33	0	1	65	98,5	31	100	34	97,1
Pêche & végétaux	28	45	2	0	75	97,3	30	93,3	45	100
Divers	32	47	0	0	79	100	32	100	47	100
Alimentation Anx	29	35	1	0	65	98,5	30	96,7	35	100
Environnement	29	30	1	0	60	98,3	30	96,7	30	100
TOTAL	186	232	6	1	425	98,4	192	96,9	233	99,6

Pour la méthode alternative, les valeurs en pourcentage calculées pour les trois critères suivants selon la norme NF EN ISO 16140 sont :

<i>exactitude relative</i> : AC	98,4 %
<i>spécificité relative</i> : SP	99,6 %
<i>sensibilité relative</i> : SE	96,9 %

Le Bureau Technique AFNOR demande que la sensibilité des deux méthodes soit recalculée en tenant compte de l'ensemble des positifs confirmés (ceci inclut les positifs supplémentaires de la méthode alternative) :

	Méthode alternative :	Méthode de référence :
sensibilité	$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 96,9 \%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 99,5 \%$

☐ Analyse des discordances

Le nombre d'échantillons discordants entre la méthode de référence et la méthode alternative est de 7.

Les deux méthodes seront considérées comme équivalentes si $m > M$.

Nombre de résultats discordants	M	m	Conclusion
7	0	1	Equivalence

La méthode BAX[®] *Salmonella* montre des résultats d'exactitude, de spécificité et de sensibilité relatives satisfaisants.

1.5.1.2. Niveau de détection relatif

L'objectif est de déterminer le niveau de contamination pour lequel moins de 50 % des réponses obtenues sont positives et celui pour lequel plus de 50 % des réponses obtenues sont positives.

Différents couples 'matrice alimentaire-souche' ont été étudiés en parallèle avec la méthode de référence et la méthode BAX[®] *Salmonella*, pour six catégories.

Les niveaux de détection, calculés selon la méthode de Spearman – Kärber (LOD₅₀), obtenus pour chaque combinaison « matrice – souche » sont les suivants :

Matrice	Souche	Niveau de détection relatif de la méthode de référence (UFC / 25 g ou 25 mL)	Niveau de détection relatif de la méthode alternative (UFC / 25 g ou 25 mL)
Viande hachée de volaille	<i>Salmonella</i> Hadar	0,3 [0,2 – 0,5]	0,4 [0,3 – 0,6]
Lait cru (protocole EPTn)	<i>Salmonella</i> Typhimurium	0,5 [0,3 – 1,0]	0,6 [0,3 – 1,0]
Coule d'œufs	<i>Salmonella</i> Enteritidis	0,4 [0,2 - 0,8]	0,4 [0,2 - 0,8]
Filet de poisson	<i>Salmonella</i> Virchow	0,3 [0,2 – 0,4]	0,3 [0,2 – 0,4]
Pâté pour chien	<i>Salmonella</i> Senftenberg	0,4 [0,3 – 0,7]	0,4 [0,3 – 0,7]
Eau de process	<i>Salmonella</i> Infantis	0,5 [0,3 – 0,9]	0,5 [0,3 – 0,9]

Le niveau de détection obtenu pour la méthode alternative est identique à celui obtenu pour la méthode de référence : il est compris entre à 0,2 et 1,0 cellules par 25 g.

1.5.1.3. Inclusivité / exclusivité

L'inclusivité et l'exclusivité de la méthode sont définies par l'analyse, respectivement, de 50 souches positives et de 30 souches négatives.

En 2002, 55 souches de Salmonella et 47 souches n'appartenant pas au genre Salmonella ont été testées par la méthode BAX[®] Salmonella automatisée.

Toutes les souches de Salmonella ont répondu positivement et aucune réaction croisée n'a été obtenue.

Pour chacune des souches, une culture en BHI, puis le test PCR ont été réalisés.

Dans l'étude AOAC-OMA de 2003, 194 souches de Salmonella et 35 souches n'appartenant pas au genre Salmonella ont été testées par la méthode BAX[®] automatisée et ont donné les résultats attendus.

Dans l'étude de comparaison des automates BAX[®] System et BAX[®] System Q7, de 2005, 49 souches de Salmonella et 20 souches n'appartenant pas au genre Salmonella ont été testées et ont donné les résultats attendus.

Les cultures ont été réalisées en 10 mL de bouillon BHI, inoculés avec une colonie et incubés 24 heures à 35°C. Les tests ont été réalisés à partir de ces cultures diluées au 1/10 (2003) ou pures (2005).

Au total, 298 souches de Salmonella et 102 souches n'appartenant pas au genre *Salmonella* ont été testées par la méthode. Ces différentes souches ont été cultivées en bouillon BHI, bouillon non sélectif utilisé juste avant la réalisation du test PCR, ce qui reprend le protocole de la méthode et est conforme au référentiel ISO 16140.

Ces résultats sont donc valables.

1.4.2 Extension de validation à l'analyse des viandes crues avec un enrichissement en 24 h en bouillon MP (réalisée par ADRIA Développement)

☐ Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative

➤ Nombre et nature des échantillons

65 échantillons ont été analysés au total.

Catégorie	Type	Nombre d'échantillons positifs	Nombre de résultats négatifs	Total
Produits carnés crus	Volaille	11	11	22
	Bœuf	12	7	19
	Autres	10	14	24
TOTAL		33	32	65

➤ Contamination artificielle des échantillons

Des contaminations artificielles ont été réalisées par des inoculations ou des contaminations croisées. 22 échantillons ont été contaminés artificiellement ; 12 ont donné un résultat positif, ce qui représente 36 % d'échantillons artificiellement contaminés.

➤ Protocoles de confirmation

Les échantillons positifs ont été confirmés par repiquage de 0,1 ml en bouillon RVS incubé 24 h ± 3 h à 41,5°C, suivi d'un isolement sur gélose Brilliance *Salmonella*. Les colonies typiques ont été confirmées par les tests latex et les tests classiques de la méthode de référence.

➤ *Résultats des essais***Tableau 1 - Viandes crues**

BAX 24 heures		
	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 21	Déviaton positive (R-/A+) PD = 5
Méthode alternative négative (A-)	Déviaton négative (A-/R+) ND = 7	Accord négatif (A-/R-) NA = 32

Tableau 2 - Calcul de l'exactitude relative (AC), de la sensibilité relative (SE) et de la spécificité relative (SP)

BAX 24 heures										
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	21	13	7	5	65	81,5	28	75,0	37	86,5

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

Les valeurs en pourcentages calculées pour la méthode alternative sont les suivantes :

	BAX 24 h
Exactitude relative (AC)	81,5 %
Spécificité relative (SP)	86,5 %
Sensibilité relative (SE)	75,0 %

En tenant compte des positifs supplémentaires obtenus par la méthode alternative, la sensibilité des deux méthodes est la suivante :

	BAX 24 h
Méthode alternative (SE)	78,8
Méthode de référence (SE)	84,7

➤ *Analyse des discordants***Déviations négatives**

N° éch.	Produit	Contamination	BAX 24 h	
			PCR	Confirmation
258	Cuisse de poule	Naturelle	-	-
274	Paupiette de veau	Naturelle	-	-
297	Rumsteck	Artificielle	-	-
342	Paupiette de veau	Naturelle	-	-
343	Paupiette de veau	Naturelle	-	-
346	Blanc de poule sans peau	Naturelle	-	-
351	Morceaux de poule avec peau	Naturelle	-	-

Pour les échantillons 258, 297, 342 et 346, les déviations négatives sont probablement imputables à l'échantillonnage, les échantillons 258, 342 et 346 étant naturellement contaminés, l'échantillon 297 étant artificiellement contaminé à un taux faible (2,6 cellules/25 g).

Le seuil de détection par la méthode BAX[®] *Salmonella* n'était probablement pas atteint pour les autres échantillons.

Enfin, les résultats d'analyse de l'échantillon 274 laissent supposer la présence d'une flore annexe très importante après 24 h d'incubation.

Déviations positives

N° éch.	Produit	Contamination	BAX 24 h
291	Steak haché frais	Artificielle	X
292	Tranche à bifteck	Artificielle	X
293	Viande hachée	Artificielle	X
298	Tranche à bifteck	Artificielle	X
546	Steak haché pur bœuf	Artificielle	X

Toutes les déviations positives ont été obtenues sur des échantillons artificiellement contaminés.

	BAX 24 h
Y = PD + ND	Y = 5 + 7 = 12
m	5
M	2
Conclusion :	m > M ; Les méthodes ne sont pas différentes

□ **Niveau de détection relatif**

➤ *Matrice utilisée*

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

La limite de détection est définie par l'analyse d'un couple matrice / souche à quatre niveaux.

Les bouillons d'enrichissement des deux méthodes étant différents, 12 échantillons ont été inoculés par taux.

La matrice testée est du steak haché, inoculé par *Salmonella infantis* 128.

➤ *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.

➤ *Résultats***Tableau 3 - Résultats 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	
	Méthode de référence	Méthode alternative
Steak haché / Salmonella infantis - Bax 24 h	0,716 [0,402 ; 1,274]	0,309 [0,124 ; 0,769]

Tableau 4 - 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	
	Méthode de référence	Méthode alternative
Steak haché / Salmonella infantis - Bax 24 h	0,7 [0,4 ; 1,3]	0,3 [0,1 ; 0,8]

Le niveau de détection relatif de la méthode de référence est compris entre 0,4 et 1,3 UFC/g, celui de la méthode alternative entre 0,1 et 0,8 UFC/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".

1.4.3 Extension de validation à l'analyse des viandes crues de bœuf avec un enrichissement entre 9 h et 24 h en bouillon MP (réalisée par ADRIA Développement)

☐ Exactitude relative, spécificité relative et sensibilité relative

➤ *Nombre et nature des échantillons*

64 échantillons ont été analysés au total.

Catégorie	Type	Nombre d'échantillons positifs	Nombre de résultats négatifs	Total
Viandes crues de bœuf	Frais	24	25	49
	Surgelé	8	5	13
	Assaisonné	2	0	2
TOTAL		34	30	64

➤ *Contamination artificielle des échantillons*

Des contaminations artificielles ont été réalisées par des inoculations. 38 échantillons ont été contaminés artificiellement ; 31 ont donné un résultat positif, ce qui représente 91,2 % d'échantillons artificiellement contaminés.

➤ *Protocoles de confirmation*

Les échantillons positifs ont été confirmés par repiquage de 0,1 ml en bouillon RVS incubé 24 h \pm 3 h à 41,5°C, suivi d'un isolement sur gélose Brilliance *Salmonella*. Les colonies typiques ont été confirmées par les tests latex et les tests classiques de la méthode de référence.

➤ Résultats des essais

Tableau 5 - Viandes crues de bœuf

BAX 9 heures		
	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 25	Déviations positives (R-/A+) PD = 4
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 4	Accord négatif (A-/R-) NA = 31

BAX 24 heures		
	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 28	Déviations positives (R-/A+) PD = 5
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 1	Accord négatif (A-/R-) NA = 30

Tableau 6 - Calcul de l'exactitude relative (AC), de la sensibilité relative (SE) et de la spécificité relative (SP)

BAX 9 heures										
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-
Viandes crues de bœuf	25	31	4	4	64	87,5	29	86,2	35	88,6

BAX 24 heures										
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-
Viandes crues de bœuf	28	30	1	5	64	90,6	29	96,6	35	85,7

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

Les valeurs en pourcentages calculées pour la méthode alternative sont les suivantes :

	BAX 9 h	BAX 24 h
Exactitude relative (AC)	87,5	90,6
Spécificité relative (SP)	88,6	85,7
Sensibilité relative (SE)	86,2	96,6

En tenant compte des positifs supplémentaires obtenus par la méthode alternative, la sensibilité des deux méthodes est la suivante :

	BAX 9 h	BAX 24 h
Méthode alternative (SE)	87,9	97,1
Méthode de référence (SE)	87,9	85,3

- *Analyse des discordants*

Déviations négatives

N° éch.	Produit	Contamination	BAX 9 h		BAX 24 h	
			PCR	Confirmation	PCR	Confirmation
290	Bavette	Artificielle	-	+	+	+
297	Rumsteck	Artificielle	-	-	-	-
543	Boulettes au bœuf	Artificielle	-	+	+	+
545	Steak grill aux oignons	Artificielle	-	+	+	+

Trois déviations négatives sont liées à un problème de seuil de détection de la méthode après 9 heures d'incubation, les confirmations montrent alors un résultat positif. Une déviation est probablement liée à l'absence de *Salmonella* dans le prélèvement, les enrichissements étant différents entre la méthode de référence et la méthode alternative : ainsi, les tests de confirmation montrent également un résultat négatif.

Déviations positives

N° échantillon	Produit	Contamination	BAX 9 h	BAX 24 h
291	Steak haché	Artificielle	+	+
292	Tranche à bifteck	Artificielle	+	+
293	Viande hachée	Artificielle	+	+
298	Tranche à bifteck	Artificielle	+	+
546	Steak haché	Artificielle	-	+

Les déviations positives sont observées après 9 heures d'enrichissement. Un enrichissement de 24 h permet d'obtenir une déviation positive supplémentaire.

	BAX 9 h	BAX 24 h
Y = PD + ND	Y = 4 + 4 = 8	Y = 5 + 1 = 6
m	4	1
M	0	0
Conclusion :	m > M Les deux méthodes ne sont pas différentes à $\alpha < 0,05$.	

La méthode BAX[®] *Salmonella* montre une exactitude, une spécificité et une sensibilité relatives satisfaisantes.

Niveau de détection relatif

➤ *Matrice utilisée*

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

La limite de détection est définie par l'analyse d'un couple matrice / souche à quatre niveaux.

Les bouillons d'enrichissement des deux méthodes étant différents, 12 échantillons ont été inoculés par taux. La matrice testée est du steak haché, inoculé par *Salmonella infantis* 128.

➤ *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 comparatives des méthodes et interlaboratoires.

➤ *Résultats***Tableau 7 - Résultats des niveaux de détection relatifs**

Couples (souche, matrice)	Niveau de détection relatif (UFC / 25 g ou 25 ml) selon le test de Spearman-Kärber ²	
	Méthode de référence	Méthode alternative
Steak haché / Salmonella infantis - Bax 9 h	0,716 [0,402 ; 1,274]	0,417 [0,159 ; 1,089]
Steak haché / Salmonella infantis - Bax 24 h		0,309 [0,124 ; 0,769]

Tableau 8 - 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	
	Méthode de référence	Méthode alternative
Steak haché / Salmonella infantis - Bax 9 h	0,7 [0,4 ; 1,3]	0,4 [0,2 ; 1,1]
Steak haché / Salmonella infantis - Bax 24 h		0,3 [0,1 ; 0,8]

Le niveau de détection relatif de la méthode de référence est compris entre 0,4 et 1,3 UFC/g, celui de la méthode alternative entre 0,1 et 1,1 UFC/g.

² "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".

☐ Inclusivité - Exclusivité

➤ *Protocoles d'essai*

- Inclusivité : 57 souches de *Salmonella* ont été inoculées à un taux compris entre 10 et 100 cellules/225 ml de bouillon MP. Le protocole complet de la méthode alternative a ensuite été appliqué.
- Exclusivité : Cette étude a été réalisée en 2002 et 2003 sur 82 souches autres que *Salmonella*.

➤ *Résultats*

- Inclusivité : toutes les souches testées ont donné un résultat PCR positif après 9 h d'incubation, excepté les souches de *Salmonella Gallinarum* Ad 300 et 1 qui ont donné une réponse positive après 24 h d'incubation. Il est à noter que la souche *Salmonella Salamae* Ad 593 montre une réaction positive après 9 heures d'incubation, dans un cas sur deux testés. Tous les tests latex se sont révélés positifs, un test douteux a été observé pour *Salmonella Wayne* Ad 502.
 - Exclusivité : aucune des souches testées n'a donné de réaction croisée.
- *Conclusion* : la méthode alternative montre une inclusivité et une exclusivité satisfaisantes.

1.4.4 Etude interlaboratoire (réalisée par l'Institut Pasteur de Lille)

1.5.4.1. Organisation de l'étude

Nombre de laboratoires participants

12 laboratoires étaient destinataires des échantillons.

Matrice utilisée

Suite aux décisions du Bureau technique de Mars 2006, la matrice alimentaire retenue était le pâté, afin de tester le protocole général.

Souche utilisée

La souche utilisée pour les contaminations est une souche de *Salmonella* Typhimurium, origine « foie de porc ».

Nombre d'échantillons par laboratoire

24 échantillons par laboratoire ont été préparés, répartis en 3 niveaux, avec 8 échantillons par niveau.

1.5.4.2. Contrôle des paramètres expérimentaux

Taux de contamination après contamination artificielle des échantillons

Niveau	Echantillons	Taux théorique ciblé (b/25g)	taux réel (b/25g d'échantillon)	Estimation de la limite inférieure de la contamination par 25g d'échantillon	Estimation de la limite supérieure de la contamination par 25g d'échantillon
Niveau 0	8-9-15-16-17-22-23-24	0	0	/	/
Niveau bas	1-2-3-6 7-13-14-18	3	5,1	1,7	11,9
Niveau haut	4-5-10-11 12-19-20-21	30	51	38	67

❑ **Problèmes de température relevée au cours du transport, température à réception et délais de réception**

- Analyse des courbes de suivi de température au cours du transport

Les courbes de températures obtenues suite à l'exploitation des données des thermoboutons montrent que les températures sont stables au cours du transport et comprises entre -2°C (labo L – température négative en fin de transport pendant 2 heures) et 5°C pour l'ensemble des laboratoires.

- Températures à réception et délais de réception

Les températures obtenues sont reprises dans les tableaux ci-dessous :

Laboratoire	Températures à réception		Commentaires
	communiquée par le laboratoire	indiquée par le thermobouton	
A	7,1°C	4,9°C	
B	9,5°C	3,9°C	
C	8,6°C	-0,1°C	
D	10,0°C	5,9°C	
E	7,5°C	6,9°C	
F	10,7°C	3,4°C	
G	3,3°C	3,4°C	
H	7,8°C	0,0°C	
I	7,0°C	3,9°C	
J	1,3°C	4,0°C	
K	4,0°C	Non réceptionné	Réception des échantillons à J+2
L	8,0°C	5,4°C	

Le laboratoire K n'a pas reçu les échantillons dans les délais et n'a pas réalisé les analyses.

Les laboratoires B, C, D et F nous a signalé des températures à réception supérieures à $8,5^{\circ}\text{C}$.

Après examen des courbes d'enregistrement, il s'avère que la température à réception est inférieure à 8°C dans tous les cas, ce qui est conforme aux exigences.

L'échantillon témoin pour la prise de température était du pâté qui s'était écrasé lors du transport (information du laboratoire B) et il n'était donc pas évident de prendre une température à réception représentative.

- Conclusion : les essais ont été réalisés par 11 laboratoires.

1.5.4.3. Résultats des analyses

 Résultats obtenus par les laboratoires collaborateurs

Les résultats positifs après confirmation obtenus par les laboratoires collaborateurs sont repris dans les tableaux suivants :

Résultats positifs obtenus par la méthode de référence

Laboratoires	Niveaux de contamination					
	L0		L1		L2	
	Obtenu	Nb échantillons	Obtenu	Nb échantillons	Obtenu	Nb échantillons
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	1	8	8	8	8	8
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	1	8	8	8	8	8
L	0	8	8	8	8	8
Total	2	88	88	88	88	88
	(a)		(b)		(c)	

Résultats positifs obtenus par la méthode alternative

Laboratoires	Niveaux de contamination					
	L0		L1		L2	
	Obtenu	Nb échantillons	Obtenu	Nb échantillons	Obtenu	Nb échantillons
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	0	8	8	8	8	8
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	0	8	8	8	8	8
L	0	8	8	8	8	8
Total	0	88	88	88	88	88
	(a)		(b)		(c)	

(a) : faux positif

(b) : vrai positif obtenu au niveau 1

(c) : vrai positif obtenu au niveau 2

☐ **Commentaires (discordances par rapport aux résultats attendus, exclusions, ... par exemple)**

Les résultats de la méthode de référence et de la méthode alternative sont **concordants** entre la méthode de référence et la méthode alternative, et conformes aux résultats attendus, pour 10 laboratoires.

Le laboratoire B retrouve par la méthode alternative un résultat positif sur un échantillon non contaminé.

Les confirmations réalisées à partir du bouillon BHI et après transfert du bouillon BHI en bouillon RVS ont conduit à un résultat final négatif, donc conforme à celui attendu.

Néanmoins, il avait été demandé à ce laboratoire de refaire dès le lendemain la subculture en bouillon BHI à partir de l'eau peptonée tamponnée conservée une nuit à 3°C et de refaire le test BAX[®] *Salmonella* : celui-ci s'est révélé négatif.

Le laboratoire E retrouve un échantillon (E16) non contaminé positif par la méthode de référence, mais à partir d'une seule colonie obtenue sur la gélose Hektoen isolée du bouillon MKTTn. Ce laboratoire a conclu lui-même à une intercontamination.

Néanmoins, nous avons considéré ce résultat comme positif.

Le laboratoire J retrouve également un échantillon (J22) non contaminé positif par la méthode de référence. La souche isolée est la même que celle introduite : il s'agit donc d'une intercontamination qui a eu lieu vraisemblablement lors du transfert en bouillons sélectifs. La méthode alternative est négative pour cet échantillon.

1.5.4.4. Calculs

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

Pour le niveau L0, il est demandé de calculer le pourcentage de spécificité (%SP) de chacune des méthodes :

$$SP = \{1 - (FP/N+)\} \times 100$$

avec TP, nombre de vrais positifs

N+, nombre total des essais L1 ou L2

Pour les niveaux L1 et L2, il est demandé de calculer le pourcentage de sensibilité (%SE) de chacune des méthodes, par rapport au nombre de résultats positifs attendus :

$$SE = (TP/N+) \times 100$$

avec TP, nombre de vrais positifs

N+, nombre total des essais L1 ou L2

Les résultats sont repris dans le tableau ci-dessous :

Niveau	Méthode de référence		Méthode alternative	
	SP/SE	LCL* %	SP/SE	LCL* %
L0	SP% = 97,7	96	SP% = 100	98
L1	SE% = 100	98	SE% = 100	98
L2	SE% = 100	98	SE% = 100	98
L1+L2	SE% = 100	98	SE% = 100	98

* LCL : low critical value, définie par la norme ISO 16140

☐ **Calcul de l'exactitude relative (AC)**

L'exactitude relative est calculée selon la formule suivante :

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

avec PA, nombre d'accords positifs

NA, nombre d'accords négatifs

	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)	Total
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif (A+/R+) PA = 176	Déviations positives (R-/A+) PD = 0	(N+) = 176
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives (A-/R+) ND = 2	Accord négatif (A-/R-) NA = 86*	(N-) = 88
Total	(N+) = 178	(N-) = 86	N = 264

* dont un échantillon positif par le test BAX[®] *Salmonella*, non confirmé

Dans cette étude l'exactitude relative est de 99,2 %.

☐ **Etude des résultats discordants**

Selon l'annexe F de la norme EN ISO 16140, le nombre de discordants au delà duquel un test statistique doit être réalisé afin de comparer les deux méthodes est de 6. Ce test statistique n'est donc pas mis en œuvre puisque **deux** résultats sont discordants entre les deux méthodes.

1.5.5.5. *Interprétation*

☐ **Comparaison des valeurs d'exactitude relative(AC), de spécificité (SP) et de sensibilité (SE)**

Les valeurs obtenues dans les deux parties de l'étude de validation sont reportées dans le tableau ci-dessous :

	Etude collaborative	Etude préliminaire
Exactitude relative (AC)	99,2 %	98,4 %
Sensibilité (SE)	100 %	99,6 %
Spécificité (SP)	100 %	96,9 %

Le Bureau Technique AFNOR demande que la sensibilité des deux méthodes soit recalculée en tenant compte de l'ensemble des positifs confirmés (ceci inclut les positifs supplémentaires de la méthode alternative) :

	Méthode alternative :	Méthode de référence :
Sensibilité	$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 100 \%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 99,2 \%$

☐ **Degré d'accord (DA)**

Le degré d'accord est le pourcentage de chances de trouver le même résultat 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.

Pour calculer le degré d'accord, il faut calculer la probabilité que deux échantillons identiques donnent le même résultat, et ceci pour chacun des laboratoires participants, et déterminer ensuite la moyenne des probabilités de l'ensemble des laboratoires.

Les degrés d'accord pour chacune des méthodes, à chacun des niveaux, sont repris dans le tableau ci-dessous :

Niveau	Méthode de référence	Méthode alternative
L0	DA % = 96 %	DA % = 100 %
L1	DA % = 100 %	DA % = 100 %
L2	DA % = 100 %	DA % = 100 %

Concordance

La concordance est le pourcentage de chances de trouver le même résultat pour deux échantillons identiques analysés dans deux laboratoires différents. Il s'agit donc de calculer le pourcentage de toutes les paires donnant les mêmes résultats sur toutes les paires possibles de résultats.

Les pourcentages de concordance pour chacune des méthodes et à chacun des niveaux sont repris dans le tableau ci-dessous :

Niveau	Méthode de référence	Méthode alternative
L0	Concordance % = 95,5 %	Concordance % = 100 %
L1	Concordance % = 100 %	Concordance % = 100 %
L2	Concordance % = 100 %	Concordance % = 100 %

Odds Ratio (COR)

Il est calculé selon la formule suivante :

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

Les odds ratio pour chacune des méthodes et à chacun des niveaux figurent dans le tableau ci-dessous :

Niveau	Méthode de référence	Méthode alternative
L0	COR % = 1,01	COR % = 1,00
L1	COR % = 1,00	COR % = 1,00
L2	COR % = 1,00	COR % = 1,00

Une valeur pour le odds ratio de 1,00 signifie que le degré d'accord et la concordance sont égaux.

Plus le Odds ratio est élevé, plus la variation interlaboratoire est prédominante.

1.4.5 Praticabilité

La praticabilité est étudiée en fonction des 13 critères définis par le bureau technique en comparant la méthode de référence à la méthode BAX[®] *Salmonella*.

Les critères définis par l'AFNOR sont renseignés ci-dessous :

<p>1. Mode de conditionnement des éléments de la méthode (Cf. notice)</p> <p>2. Volume des réactifs (Cf. notice et emballage des flacons)</p>	<p>Les tests sont conditionnés en coffret carton contenant :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 96 tubes PCR avec comprimé pour la détection de <i>Salmonella</i> et présentés sous forme de barrettes de 8 tubes, et répartis dans deux sachets. - un sachet supplémentaire de capuchons optiques transparents pour tubes PCR. - le réactif de lyse et la protéase présentés en flacons sur un petit portoir carton <p>Les volumes sont indiqués sur les flacons :</p> <ul style="list-style-type: none"> - tampon de lyse : 2 fois 12 mL - protéase : 400 µL
<p>3. Condition de stockage des éléments (Cf. notice) – Péréemption des produits non ouverts (Cf. notice)</p>	<p>La température de stockage du test est de 2-8°C et est indiquée sur l'emballage ainsi que sur chacun des réactifs.</p>
<p>4. Modalités d'utilisation après première utilisation (Cf. notice)</p>	<p>Le réactif de lyse, une fois reconstitué, se conserve 15 jours à 2-8°C.</p>
<p>5. Equipements ou locaux spécifiques nécessaires (Cf. notice)</p>	<p>Pour la préparation des échantillons :</p> <ul style="list-style-type: none"> - un incubateur à 37°C - deux blocs chauffants à 37°C et à 95°C - un bloc refroidissant <p>Pour l'amplification et la détection:</p> <ul style="list-style-type: none"> - l'automate BAX[®] ou BAX[®] Q7
<p>6. Réactifs prêts à l'emploi ou à reconstituer (Cf. notice)</p>	<p>Tous les réactifs sont prêts à l'emploi à l'exception du réactif de lyse à reconstituer. La reconstitution est clairement expliquée dans la notice.</p>
<p>7. Durée de formation de l'opérateur non initié à la méthode</p>	<ul style="list-style-type: none"> - pour un opérateur uniquement formé aux techniques classiques de microbiologie, la formation à la technique nécessite 2 à 3 jours - pour un opérateur formé à l'analyse PCR, la formation nécessite moins de 1 jour

8. Temps réel de manipulation – Flexibilité de la méthode par rapport au nombre d'échantillons à analyser

Etapes	Temps moyen pour un échantillon (min)		Temps moyen pour 48 échantillons (min)	
	Norme	Alternative	Norme	Alternative
Préparation, pesée, dilution en EPT et broyage	7	7	120	120
Repiquage sur bouillons sélectif				
- RVS et MKTTn	3		90	
- BHI		1		45
Réalisation du test BAX®	/	1	/	45
Isolement des RVS et MKTTn, à 24h d'incubation, sur deux milieux sélectifs, incluant le codage des boîtes et lectures	10	/	150	/
TOTAL par échantillon	20 minutes	9 minutes	7 minutes 30	4 minutes 30

Dans le cas de séries d'échantillons tous positifs, il faut rajouter le temps nécessaire aux confirmations.

Le temps moyen pour la confirmation d'une colonie suspecte à partir d'une gélose sélective a été estimé à environ 5 minutes.

Pour la méthode alternative, il faut ajouter le temps nécessaire au repiquage du bouillon BHI et à l'isolement sur géloses sélectives, soit environ 1,5 minute par échantillon.

L'intérêt de la méthode réside notamment dans la possibilité de trier les échantillons négatifs des échantillons suspects et d'alléger ainsi les confirmations.

De plus, les temps de manipulations sont réduits par rapport à la méthode de référence.

9. Délai d'obtention des résultats

Echantillons négatifs

Etape	<u>Délai obtenu</u> méthode BAX® <i>Salmonella</i>	<u>Délai obtenu</u> méthode de référence ISO 6579
Réalisation du préenrichissement	J0	J0
Ensemencements des différents bouillons d'enrichissement (Rappaport-Vassiliadis Soja, MKTTn, BHI)	J1	J1
Réalisation du test PCR	J1	/
Isolement des bouillons sélectifs sur gélose sélective	/	J2
Obtention des résultats négatifs si test négatif	J1	J3 à J7

Echantillons positifs

Etape	<u>Délai obtenu</u> méthode BAX® <i>Salmonella</i>	<u>Délai obtenu</u> méthode de référence ISO 6579
Réalisation du préenrichissement	J0	J0
Ensemencements des différents bouillons d'enrichissement (Rappaport-Vassiliadis Soja, MKTTn, BHI)	J1	J1
Réalisation du test PCR	J1	/
Isolement des bouillons d'enrichissement sur gélose sélective	J1 à J2	J2
Lecture des boîtes Tests de confirmation : galeries, sérologie	J2 à J3	J3 à J4
Obtention des résultats positifs par les tests de la méthode de référence (étape de purification incluse)	J4 à J5	J5 à J7

10. Type de qualification de l'opérateur	niveau au moins à celui nécessaire pour la méthode de référence
11. Etapes communes avec la méthode de référence	<u>étape de préenrichissement</u> pesée, dilution au 1/10 dans de l'eau peptonée tamponnée et incubation 16 à 20 heures à 37°C
12. Traçabilité des résultats d'analyse	Les résultats sont identifiés sur le logiciel et peuvent être édités individuellement avec toutes les informations les concernant.
13. Maintenance par le laboratoire	Les performances de l'automate amplificateur/détecteur doivent être vérifiées toutes les deux semaines. Des plaques de calibration/vérification ont été livrées avec l'automate et les instructions de vérification sont clairement exposées dans le manuel d'utilisation.

1.4.6 Conclusion

L'étude comparative des méthodes a été réalisée selon le référentiel ISO 16140.

L'étude comparative des méthodes a permis d'obtenir des résultats :

- d'exactitude relative, de spécificité relative et de sensibilité relative,
- de niveau de détection relative,
- d'inclusivité et d'exclusivité.

Les performances de la méthode BAX[®] *Salmonella* sont équivalentes à celles à la méthode de référence ISO 6579 (2002).

Les résultats de **l'étude interlaboratoire** montrent que la variabilité de la méthode alternative (degré d'accord, concordance, Odds ratio) est identique à celle de la méthode de référence, puisque tous les échantillons contaminés, retrouvés négatifs, l'ont été par les deux méthodes.

1.5 Bilan des modifications intervenues dans la méthode alternative, ayant donné lieu ou non à une extension de validation

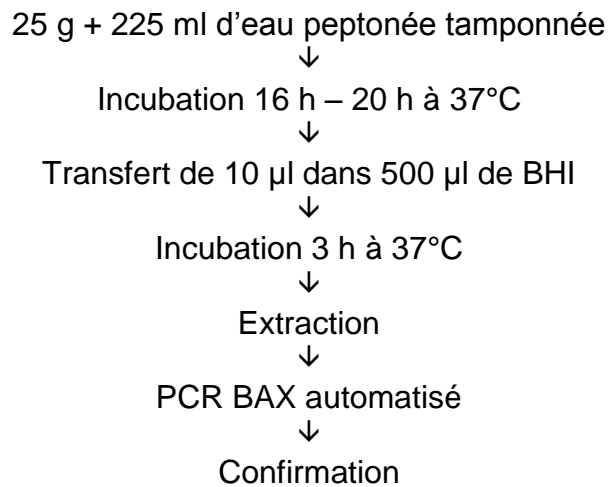
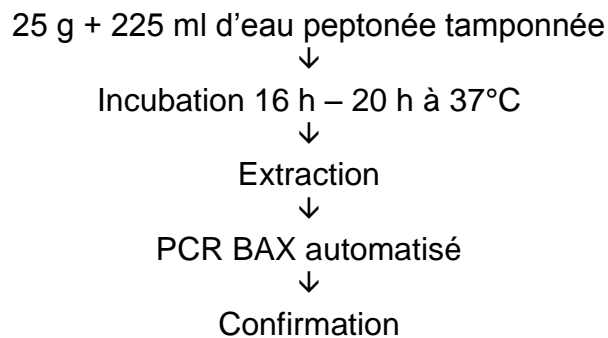
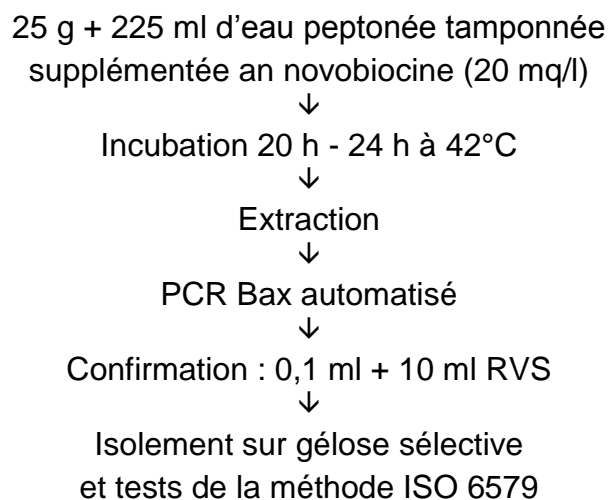
Aucune modification n'est intervenue dans la méthode depuis la dernière validation.

2 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Huit articles ont été référencés ; ces articles contribuent à mettre en évidence les performances de la méthode BAX[®] *Salmonella*, en complément de l'étude de validation ISO 16140 :

2010	Koyuncy S. <i>et al.</i> (2010) Appl Environ Microbio. 76(9) 2815-22	Comparaison des méthodes PCR pour la détection de <i>Salmonella</i> dans les aliments pour animaux. Les performances des méthodes sont comparables à celles des méthodes culturales testées (MSRV et NMKL 71). Il apparaît parfois difficile de confirmer les résultats PCR.
2009	Löfström C <i>et al.</i> (2009) BMC Microbiol. May 7, 9-85	Validation Nordval de la méthode BAX <i>Salmonella</i> pour l'analyse de viandes crues et prélèvements de carcasses : résultats d'étude comparative des méthodes et d'étude inter-laboratoire.
2009	Tice G. <i>et al.</i> (2009) J AOAC Int. 92 (3) 989-94	Etude interne pour la validation AOAC-RI de la méthode BAX <i>Salmonella</i> : résultats des études comparative des méthodes, d'inclusivité et d'exclusivité
2009	Tice G <i>et al.</i> (2009) J AOAC Int. 92(6) 1902-5	Validation AOAC-RI de la méthode BAX <i>Salmonella</i> par l'analyse de beurre de cacahouète : les résultats de l'étude inter-laboratoire montrent des performances comparables à celles de la méthode FDA-BAM et la méthode BAX <i>Salmonella</i> .
2008	Tomazelli IB <i>et al.</i> (2008) J Food Prot 71(12) 2442-7	Comparaison de la méthode BAX <i>Salmonella</i> à la méthode officielle du Brésil pour la détection des salmonelles dans les aliments, l'eau et les échantillons d'environnement : les résultats des études comparatives des méthodes montrent des performances similaires entre les deux méthodes testées.

2007	D'Aoust JY <i>et al.</i> (2007) J. Food Prot., 70(4) 835-40	Comparaison de la sensibilité des méthodes BAX <i>Salmonella</i> basées sur (i) la PCR en temps réel avec emploi de la chimie SybrGreen et (ii) la PCR en point final couplée à l'analyse par électrophorèse L'analyse de 95 échantillons naturellement contaminés montre des performances comparables entre les deux méthodes.
2007	Cheung PY <i>et al.</i> (2007) J Appl Microbiol. 103(1) 219-27	Utilisation de la méthode BAX pour la détection des salmonelles dans les aliments prêts à consommer : la méthode BAX montre des résultats comparables aux méthodes culturales testées.
2007	Parveen S <i>et al.</i> (2007) J Food Prot. 70(11) 2466-72	Etude de prévalence et de résistance de Salmonelles isolées des abattoirs de volailles en employant la méthode BAX <i>Salmonella</i> .

Annexe 1 - Méthode alternative**□ Protocole général, à l'exception des viandes et volailles crues****□ Protocole viandes et volailles crues****□ Protocole produits laitiers hors poudres de lait**

Annexe 2 - Méthode de référence
NF EN ISO 6579 : 2002 : Microbiologie des aliments
Méthode horizontale pour la recherche de Salmonella

