



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

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

N° attestation : BIO 12/1 – 04/94

Date de validation :	06.04.1994
Dates de reconduction:	06.09.1998
	18.09.2002
	15.09.2006*
	20.05.2010
Fin de validité :	09.06.2014

* Le protocole EN ISO 16140 a été mis en œuvre lors de la 3^{ème} reconduction en 2006

La Société
(siège social, distributeur et site de production)

BIOMERIEUX
69280 MARCY L'ETOILE
FRANCE

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

VIDAS Salmonella (VIDAS SLM) – Réf. 30 702
Protocole double voie pour la détection rapide des *Salmonella*

Référence du protocole : 06984 version (Q)

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine et alimentation pour animaux de compagnie.

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune.

METHODE DE REFERENCE

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

Le kit VIDAS SLM est un système automatisé utilisant un test immuno-enzymatique permettant la détection d'antigènes *Salmonella* par la méthode ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay).

La méthode VIDAS SLM consiste en un préenrichissement en eau peptonée tamponnée suivi d'un enrichissement en bouillons sélectifs (bouillons RVS et MKTTn pendant 6 à 8 heures) suivi chacun d'un post-enrichissement en bouillon M pendant 16 à 20 heures, à l'issue duquel est réalisé le test VIDAS.

Chaque test se décompose en deux éléments :

- le cône à usage unique, servant à la fois de phase solide et de système de pipetage pour le test. L'intérieur du cône est recouvert d'anticorps anti *Salmonella* adsorbés sur sa surface.
- La cartouche qui contient tous les réactifs prêts à l'emploi nécessaires pour le test.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue du test VIDAS SLM doivent être confirmés par isolement des milieux d'enrichissement MKTTn et RVS dont l'incubation a été poursuivie pendant 16-20 heures, sur une gélose sélective, selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification).

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

NOTE : Historique de validation

Lors de l'étude de reconduction de 2006, certains résultats obtenus en 2002 lors de l'étude comparative ont été conservés.

L'étude comparative a été complétée selon la norme EN ISO 16140 pour :

- la partie exactitude/sensibilité/spécificité relative pour la catégorie alimentation animale, et sur les autres catégories pour les contaminations artificielles qui ont été refaites.
- La partie inclusivité/exclusivité

L'étude interlaboratoire a été entièrement refaite selon le nouveau protocole EN ISO 16140.

En mai 2010, la reconduction de la méthode VIDAS SLM protocole double voie a été validée sans essais complémentaires, puisque depuis la dernière validation, la méthode alternative n'a pas été modifiée et la méthode de référence et le protocole de validation n'ont pas changé. L'étude d'inclusivité a été complétée selon les exigences particulières AFNOR 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 2002 et 2006 sur un total de 328 échantillons de produits dont 65 naturellement contaminés, 87 artificiellement contaminés et 176 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : Produits carnés, produits laitiers, produits de la pêche, produits végétaux, divers, alimentation pour animaux de compagnie.

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

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

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 151 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 0 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 1 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 176 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) et (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 : **AC = 99,7%**
- Spécificité relative : **SP = 100%**
- Sensibilité relative : **SE = 99,3%**

Conclusion

Les deux méthodes ne sont pas différentes en termes statistiques.

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2006, sur les 5 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : produits carnés, produits laitiers, produits de la pêche et végétaux, divers, alimentation pour animaux de compagnie.

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 de volaille	<i>Salmonella</i> Hadar	0,5 [0,3 - 0,9]	0,5 [0,3 - 0,9]
Lait cru	<i>Salmonella</i> Typhimurium	0,7 [0,4 - 1,1]	0,7 [0,4 - 1,1]
Filet de poisson	<i>Salmonella</i> Enteritidis	0,7 [0,3 - 1,4]	0,7 [0,3 - 1,4]
Coule d'oeuf	<i>Salmonella</i> Virchow	0,4 [0,3 - 0,5]	0,4 [0,3 - 0,5]
Pâté pour animaux	<i>Salmonella</i> Senftenberg	0,7 [0,5 - 1,1]	0,7 [0,5 - 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 Used 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 est identique à celui de la méthode de référence. Il se situe entre 0,3 et 1,4 cellules par 25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 51 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 51 testées.
- L'étude de 30 souches non *Salmonella* a montré des réactions croisées avec les souches suivantes, à partir de cultures en bouillon non sélectif (eau peptonée tamponnée) : *Citrobacter diversus* (deux souches) et *Citrobacter freundii*.
Seules les deux souches de *Citrobacter diversus* ont donné une réaction positive par le protocole complet de la méthode alternative.

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 le kit VIDAS SLM (en incluant les tests classiques décrits dans la norme de référence y compris l'étape de purification) comme avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours avec le kit VIDAS SLM contre 3 à 7 jours avec la méthode de référence.
 - Dans le cas de résultats présumés positifs avec le kit VIDAS SLM, mais rendus négatifs après confirmation, les résultats négatifs sont obtenus en 3 à 7 jours

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2006 avec 15 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Salmonella* Typhimurium aux 3 niveaux suivants :

- niveau 0
- niveau 3 cellules/ml
- niveau 30 cellules/ml

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

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	120	95	79***	79	79	0	0
1	120	96	80	0	0	80	80
2	120	96	80	0	0	80	80

* Trois laboratoires n'ont pas réalisé les analyses.

** Deux laboratoires ont mal réalisé les manipulations. Leurs résultats ne sont pas exploités.

*** un laboratoire n'a fourni que 7 résultats sur 8 attendus pour le niveau L0, suite à un problème lors des manipulations.

Calculs

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

Interprétation

Les résultats de l'étude interlaboratoire 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** :

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100	98,8*	1,01
L1	100	100	1,00
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	98,8*	1,01
L1	100	100	1,00
L2	100	100	1,00

* Les pourcentages de concordance de la méthode de référence et de la méthode alternative, inférieurs à 100% au niveau L0, sont dus au fait qu'un laboratoire n'a fourni que 7 résultats sur 8 attendus, suite à un problème lors des manipulations.

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