



**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 : BIO 12/16 – 09/05

Date de validation :	20.09.2005
Date d'extension :	04.12.2007
Date de reconduction :	03.07.2009
Fin de validité :	20.09.2013

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 Easy Salmonella – Ref. 30 702

Référence du protocole : 06984 version (Q)

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine et animale, et prélèvements d'environnement (hors environnement d'élevage)

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune

METHODE DE REFERENCE

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

A handwritten signature in black ink, appearing to read "JBESLIN", written over a horizontal line.

Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN

PRINCIPE DE LA METHODE

VIDAS *Salmonella* 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 Easy *Salmonella*** consiste en un préenrichissement en eau peptonée tamponnée suivi d'un ensemencement de 0,1 ml en SX2, à l'issue duquel est réalisé le test VIDAS *Salmonella*.

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 de la méthode **Vidas Easy *Salmonella*** doivent être confirmés à partir du bouillon SX2, selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification). La confirmation peut être réalisée après conservation du bouillon SX2 à 2-8°C jusqu'à 72 heures.

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)

1/ La méthode VIDAS Easy *Salmonella* a été initialement **validée en 2005**. Le protocole comportait une étape d'enrichissement en bouillon SX. **En 2007, une étude d'extension** a porté sur la modification du bouillon SX en bouillon SX2, et sur la réduction des durées d'incubation du bouillon. Des essais complémentaires ont été réalisés sur la méthode avec bouillon SX2 (exactitude/spécificité/sensibilité relatives, niveau de détection relatif et inclusivité). Les résultats sont inclus dans la présente attestation. L'étude interlaboratoire réalisée en 2005 sur bouillon SX n'a pas été refaite sur bouillon SX2 en accord avec les exigences de la norme EN ISO 16140. La méthode était alors validée avec les bouillons SX et SX2.

En juin 2010, l'attestation a été rééditée pour prendre en compte le **remplacement définitif du bouillon SX par le bouillon SX2**.

2/ Lors de l'étude de **reconduction de 2009**, aucun essai complémentaire n'a été réalisé, la méthode VIDAS Easy *Salmonella* n'ayant pas été modifiée, et la méthode de référence et le protocole de validation restant inchangés.

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 2007 avec le bouillon **SX2** sur un total de 414 échantillons de produits dont 54 naturellement contaminés, 142 artificiellement contaminés et 218 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits carnés, produits laitiers, produits de la mer et végétaux, divers (dont pâtisseries, œufs, dérivés), échantillons d'environnement (prélèvements de surface, eaux diverses, résidus) et aliments pour animaux.

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 = 192 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 2 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 2 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 218 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) (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 = 99,0%**
- Spécificité relative : **SP = 99,1%**

Note : une spécificité relative inférieure à 100% résulte de positifs supplémentaires confirmés de la méthode alternative, considérés comme des déviations positives (faux positifs) par la norme EN ISO 16140

- Sensibilité relative : **SE = 99,0%**

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 :
 $(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 99,0\%$

Méthode de référence :
 $(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 99,0\%$

Conclusion

Les deux méthodes alternative et de référence sont équivalentes en termes statistiques

Conservation des bouillons SX2 pendant 72 heures à 2-8°C

Lors de l'étude d'extension de 2007, les bouillons SX2 ont été conservés 72 heures à 2-8°C, puis à nouveau testés par VIDAS SLM.

Les résultats étaient identiques aux résultats obtenus directement après incubation, à l'exception d'un résultat négatif qui est devenu positif supplémentaire (avec une valeur à la limite du seuil et des colonies de *Salmonella* retrouvées seulement après repiquage du bouillon SX2 en bouillon RVS, et uniquement sur gélose SMID2).

NIVEAU DE DETECTION relatif

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

Des essais ont été effectués en 2007 avec le bouillon **SX2**, 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 de la mer et végétaux, divers, échantillons d'environnement et aliments pour animaux.

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	S. Hadar	0,4 [0,2 – 0,6]	0,4 [0,2 – 0,6]
Lait cru	S.Typhimurium	0,5 [0,3 – 0,8]	0,5 [0,3 – 0,8]
Filet de loup	S.Virchow	0,5 [0,3 – 0,9]	0,5 [0,3 – 0,9]
Coule d'œufs	S.Enteritidis	0,5 [0,3 – 0,8]	0,5 [0,3 – 0,8]
Eau de process	S.Newport	0,4 [0,2 – 0,7]	0,4 [0,2 – 0,7]
Pâtée pour animaux	S.Senftenberg	0,5 [0,3 – 1,0]	0,5 [0,3 – 1,0]

(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 avec le bouillon SX2 est identique à celui de la méthode de référence : il se situe entre 0,2 et 1,0 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE (études en 1994, 2002 et 2007)

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- En 2007 : 51 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 51 testées avec la méthode VIDAS Easy *Salmonella* utilisant le bouillon SX2.
- L'étude de 30 souches non *Salmonella* a montré des réactions croisées avec le test VIDAS Easy *Salmonella* pour les souches suivantes, à partir de cultures en bouillon non sélectif (eau peptonée tamponnée) : *Citrobacter diversus* (deux souches) et *Citrobacter freundii*. Ces souches ont été re-testées par le protocole complet de la méthode alternative et les résultats restent positifs pour les *Citrobacter diversus*. Les isolements des bouillons SX2 sur géloses sélectives donnent néanmoins des colonies non typiques de *Salmonella*.

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 confirmation avec étape de purification) comme avec 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 2005 avec 15 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 (taux visés) :

- 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. Pour la méthode VIDAS Easy Salmonella, le bouillon SX a été utilisé.

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	112	104	101	97 ⁽¹⁾	3	7
1	120	112	104	4	4	100	100
2	120	112	104	0	0	104	104

* Un laboratoire n'a pas réalisé les analyses en raison d'une réception des échantillons hors délai.

** Les résultats d'un laboratoire n'ont pas été pris en compte car tous les échantillons, y compris les échantillons non contaminés, ont été retrouvés positifs par les deux méthodes. Une intercontamination a vraisemblablement eu lieu dès l'étape de préparation des suspensions mères.

(1) dont un échantillon positif en VIDAS Salmonella et non confirmé

Commentaires : plusieurs laboratoires ont obtenu des résultats positifs sur des échantillons non contaminés, avec la méthode de référence (3 échantillons) et avec la méthode alternative (7 échantillons dont un commun avec la méthode de référence). Dans tous ces cas, la souche a été retrouvée et est la même que celle introduite pour la contamination des échantillons positifs, ce qui valide l'hypothèse de l'intercontamination.

Calculs

- L'exactitude relative est de **97,4%**
- La spécificité est de **93,3%**

Note : une **spécificité relative** inférieure à 100% résulte de positifs supplémentaires confirmés de la méthode alternative, considérés comme des déviations positives (faux positifs) par la norme EN ISO 16140

- La sensibilité est de **98,1%**

Interprétation

Les résultats de l'étude collaborative sont comparables à ceux obtenus lors de l'étude préliminaire pour les valeurs d'exactitude relative et de sensibilité. Ils sont différents pour la spécificité suite aux résultats positifs obtenus sur des échantillons initialement non contaminés.

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 99,1\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 97,2\%$$

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 répliqués 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 répliqués donnant le même résultat.

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

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

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	90%	87%	1,03
L1	94%	92%	1,01
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	95%	94%	1,01
L1	94%	92%	1,01
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 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