



**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 12/23 – 05/07**

Date de validation : **24.05.2007**

Extension de validation: **04.12.2007**

Fin de validité : **24.05.2011**

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

**BIOMERIEUX
69280 MARCY L'ETOILE**

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

VIDAS Immuno-Concentration Salmonella II (VIDAS ICS2) + Boîte
Référence 30708

Référence du protocole : 13614 version **G**

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine (sauf lait cru) et aliments pour animaux.

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune

METHODE DE REFERENCE

EN ISO 6579 :2002 – Microbiologie des aliments – Méthode horizontale de recherche des *Salmonella* spp

**Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN**

AFAQ AFNOR Certification

Siège : 11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France

Bureaux : 116, avenue Aristide Briand – BP 40 – 92224 Bagneux Cedex 6 – France

Tél +33 (0)1 46 11 37 00 – Fax +33 (0)1 46 11 39 40

certification@afaq.afnor.org - www.afnor-validation.org

PRINCIPE DE LA METHODE

Le test VIDAS ICS2 + Boîte met en œuvre une capture immunologique automatisée et un procédé de relargage spécifique, permettant la concentration de *Salmonella* à partir du bouillon de pré-enrichissement. Les bactéries relarguées sont ensuite détectées par ensemencement sur un milieu sélectif des *Salmonella*. Les milieux sélectifs utilisés sont SMID2 et XLD. Pour les matrices type volailles crues, le milieu XLT4 peut également être utilisé.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue du test VIDAS ICS2 + boîte doivent être confirmés.

Les colonies typiques sur milieux sélectifs doivent être identifiées de l'une des manières suivantes :

- Identification de 1 à 5 colonies par les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN, l'ISO ou l'AFNOR (en incluant l'étape de purification)
- Réalisation d'une galerie API® à partir d'une colonie isolée prélevée directement sur gélose sélective, en vérifiant en parallèle la pureté de la souche sur gélose nutritive.

Si la confirmation ne peut pas être initiée immédiatement, les milieux peuvent être conservés jusqu'à 48 heures à 2-8°C.

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé par les tests décrits ci-dessus, le laboratoire devra mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

NOTE

Six protocoles de préenrichissement sont proposés en fonction des catégories de produits alimentaires suivantes :

- Produits chocolatés sauf cacao
- Cacao
- Ovoproduits
- Viande de volaille crue
- Poudre de lait
- Autres produits (protocole général)

En décembre 2007, une extension de validation a été prononcée afin d'inclure dans le champ d'application de la méthode tous les aliments pour animaux (catégorie auparavant restreinte aux aliments pour animaux de compagnie).

Un complément d'étude a été réalisé par le laboratoire expert, sur l'exactitude, la spécificité et la sensibilité relatives. Des échantillons de tourteaux et farines ont été testés de manière à compléter la catégorie alimentation animale avec au moins 20 échantillons positifs et 20 échantillons négatifs (30 échantillons positifs et 29 échantillons négatifs ont été testés).

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 sur - au total - 367 échantillons de produits dont 40 naturellement contaminés, 145 artificiellement contaminés et 182 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : produits laitiers, produits carnés, produits de la pêche et végétaux, divers, et alimentation animale.

Tous les échantillons ont été analysés **en simple** par les **deux méthodes**, avec une gélose XLD et avec une gélose SM ID2. La gélose XLT4 a été utilisée dans le cas des échantillons à base de volaille.

Tableau de résultats (Cf. tableau 1 de la norme EN ISO 16140) avec gélose XLD

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 178 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 1 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 6 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 182 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

(3) dont un échantillon présumé positif par la méthode alternative et par la méthode de référence, négatif après confirmation

Tableau de résultats (Cf. tableau 1 de la norme EN ISO 16140) avec gélose SM ID2

Réponses	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 179 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 1 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 5 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 182 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

(3) dont un échantillon présumé positif par la méthode alternative et par la méthode de référence, négatif après confirmation

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

	VIDAS ICS2+ boîte avec gélose XLD	VIDAS ICS2+ boîte avec gélose SM ID2
Exactitude relative : AC %	98,1	98,4
Spécificité relative : SP %	99,5	99,5
Sensibilité relative : SE %	96,7	97,3

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 :
Avec gélose XLD	$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 96,8\%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 99,5\%$
Avec gélose SM ID2	$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 97,3\%$	

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

Avec gélose XLD:

PD = 1, ND = 6 donc $Y = PD + ND = 7$; $6 \leq Y \leq 22$ $m = 1, M = 0$ donc $m > M$

Avec gélose SM ID2:

PD = 1, ND = 5 donc $Y = PD + ND = 6$; $6 \leq Y \leq 22$ $m = 1, M = 0$ donc $m > M$

Conclusion

Quelle que soit la gélose utilisée, 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 2007, sur les 5 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

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

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

Les résultats obtenus sont les suivants, avec utilisation des gélose mentionnées ci-dessous:

- (a) VIDAS ICS2 + boîte avec gélose XLD
- (b) VIDAS ICS2 + boîte avec gélose SM ID2
- (c) VIDAS ICS2 + boîte avec gélose XLT4 (volailles)

		Niveau de détection relatif LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g)	
Matrice	Souche	Méthode alternative	Méthode de référence
Viande de volaille crue	<i>Salmonella</i> Hadar	0,4 [0,2 – 0,7] (a) 0,5 [0,3 – 0,8] (b) 0,4 [0,2 – 0,7] (c)	0,6 [0,4 – 1,1]
Poudre de lait	<i>Salmonella</i> Agona	0,4 [0,2 – 0,6]	0,3 [0,2 – 0,6]
Coule d'œufs	<i>Salmonella</i> Enteritidis	0,4 [0,3 – 0,7]	0,3 [0,2 – 0,5]
Cacao	<i>Salmonella</i> Anatum	0,5 [0,3 – 0,8] (a) 0,5 [0,3 – 1,0] (b)	0,6 [0,3 – 1,0]
Pâté pour chien	<i>Salmonella</i> Senftenberg	0,4 [0,3 – 0,5]	0,4 [0,3 – 0,5]

(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 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 se situe entre 0,2 et 0,8 UFC/25 g avec la gélose XLD.

Le niveau de détection de la méthode alternative se situe entre 0,2 et 1,0 UFC/25 g avec la gélose SM ID2.

Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,2 et 1,1 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 55 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 55 testées.
- Sur 34 souches non *Salmonella*, 3 souches de *Proteus mirabilis* ont montré des colonies typiques sur gélose XLD et non typiques sur gélose SM ID2. Ces souches n'ont pas été identifiées comme étant des *Salmonella*.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 3 à 4 jours avec la méthode alternative contre 5 à 6 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 2 jours avec la méthode alternative contre 3 à 6 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 4 jours.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2007 avec 18 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 légèrement supérieur au niveau de détection relatif (3 cellules / 25 ml)
- niveau 10 fois supérieur au niveau précédent (30 cellules / 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	144	144	144	135	139	9*	5*
1	144	144	144	2	2	142	142
2	144	144	144	0	0	144	144

* Commentaires : plusieurs laboratoires ont obtenu des résultats positifs sur des échantillons non contaminés, avec la méthode de référence (9 échantillons) et avec la méthode alternative (5 échantillons). 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 97,7 %
- La spécificité est de 96,5 %
- La sensibilité est de 99,3 %

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

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 97,7\%$$

Méthode de référence :

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

Cette différence résulte du fait que les positifs supplémentaires de la méthode de référence résultent d'intercontaminations d'échantillons négatifs par des échantillons positifs.

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	94,6	93,2	1,3
L1	97,6	97,2	1,1
L2	100	100	1,0

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	93,6	88,0	2,0
L1	97,6	97,2	1,1
L2	100	100	1,0

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