



**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 12/26 – 07/09

Date de validation :	03.07.2009
Fin de validité :	03.07.2013

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

BIOMERIEUX
Chemin de l'Orme
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 Xpress (SLMX)
Réf. 30 709

Référence du protocole : **14563 version C**

DOMAINE D'APPLICATION

Viandes crues de bœuf et de veau (dont surgelées, non assaisonnées) et ovoproduits pasteurisés.

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**

AFNOR Certification

11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France
Tél +33 (0)1 41 62 80 00 – Fax +33 (0)1 49 17 90 00
certification@afnor.org - www.afnor-validation.org

PRINCIPE DE LA METHODE

VIDAS® *Salmonella* Xpress (SLMX) est un test immunoenzymatique, permettant la détection d'antigènes de *Salmonella* par la méthode ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) grâce au système automatisé VIDAS®. La méthode consiste en un enrichissement en eau peptonée tamponnée (incubé 16-24 heures à 41,5°C±1°C), suivi du test VIDAS® SLMX.

Chaque test se compose de deux éléments :

- un cône (SPR®) à usage unique, servant à la fois de phase solide et de système de pipetage, dont l'intérieur est recouvert d'anticorps anti-*Salmonella* adsorbés sur sa surface.
- une cartouche qui contient tous les autres réactifs prêts à l'emploi nécessaire à la réaction immunologique.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode VIDAS® *Salmonella* Xpress doivent être confirmés, dans les 72 heures suivant la fin de l'incubation, à partir du bouillon d'enrichissement non chauffé conservé à 2-8°C, de l'une des manières suivantes :

- A partir de 1 à 5 colonies caractéristiques (isolées préalablement sur 2 géloses sélectives) par les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification)
- A partir de toute autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION, de principe différent de celui de la méthode VIDAS® *Salmonella* Xpress. Le protocole validé de la seconde méthode devra être respecté dans son ensemble, c'est à dire que toutes les étapes antérieures à l'étape intermédiaire de laquelle on repart pour la confirmation doivent être communes aux deux méthodes

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé par l'une des options décrites ci-dessus), le laboratoire devra mettre en oeuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

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 2009 sur 124 échantillons de produits dont aucun naturellement contaminé, 63 artificiellement contaminés et 61 non contaminés, appartenant aux catégories d'aliments suivantes : Viandes crues de boeuf et de veau (dont surgelées, non assaisonnées) et ovoproduits pasteurisés.

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 = 63 ^{(1)**}	Déviations positives A+ / R- PD = 0 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 0 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 61 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés ;

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

** Note :

- catégories "Oeufs pasteurisés" : dont un résultat VIDAS positif (1,6%) confirmé uniquement sur gélose XLD ;
- catégorie "Viandes crues" : dont 6 résultats VIDAS positifs (9,5 %) et 7 résultats VIDAS positifs (11 %) non confirmés après isolement direct, respectivement sur gélose Chrom ID *Salmonella* et sur gélose XLD, dont 2 négatifs sur les deux géloses.

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

- Exactitude relative : **AC = 100%**
- Spécificité relative : **SP = 100%**
- Sensibilité relative : **SE = 100%**

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

Conclusion

Les performances de la méthode VIDAS® *Salmonella* Xpress 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 2009, sur les 6 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : Viandes crues de boeuf et de veau (dont surgelées, non assaisonnées) et ovoproduits pasteurisés.

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 boeuf	<i>Salmonella</i> Montevideo	0,5 [0,3 – 0,8]	0,8 [0,5 – 1,2]
Coule d'œufs	<i>Salmonella</i> Enteritidis	0,5 [0,3 – 0,7]	0,4 [0,3 – 0,6]

(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 0,3 et 0,8 UFC/25 g.
Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,3 et 1,2 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 52 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 52 testées.
- L'étude de 30 souches non *Salmonella* a mis en évidence des réactions croisées avec 2 souches de *Citrobacter diversus*. Ces souches n'ont pas été détectées par la méthode de référence.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- Délai d'obtention des résultats :
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 3 à 6 jours avec la méthode alternative contre 5 à 7 jours pour la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 1 jour 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 2 à 6 jours.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2009 avec 14 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de viande hachée de boeuf, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Salmonella* Typhimurium aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC/25g
- 3 UFC/25g
- 30 UFC/25g

Les laboratoires ont testé, par les **deux méthodes**, **8 réplicats** pour **chaque niveau** de contamination, soit 24 analyses par laboratoire participant, représentant au total 336 analyses.

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	112	112	80	80	80	0	0
1	112	112	80	0	0	80	80
2	112	112	80	0	0	80	80

* Les résultats de 4 laboratoires ont été exclus de l'interprétation : 2 pour cause de réception tardive des échantillons, et 2 autres suite à problème d'intercontamination des échantillons.

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.

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 :

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

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	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%	100%	1,00
L1	100%	100%	1,00
L2	100%	100%	1,00

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