



**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 12/32 – 10/11

Date de validation : 06.10.2011

Fin de validité : 06.10.2015

La Société **bioMérieux**  
Chemin de l'Orme  
69280 MARCY L'ETOILE, France

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

**VIDAS® Up Salmonella**

Référence du protocole : Réf. 30 707 – version 9300912 C

**DOMAINE D'APPLICATION**

Produits d'alimentation humaine (hors fromages au lait cru) et animale, et les échantillons d'environnement (hors échantillons de production primaire).

**RESTRICTIONS**

Aucune.

**METHODE DE REFERENCE**

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

Directrice Générale  
Florence MÉAUX



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

[www.afnor.org](http://www.afnor.org) - [www.afnor-validation.org](http://www.afnor-validation.org)

## PRINCIPE DE LA METHODE

VIDAS® UP *Salmonella* (SPT) est un test immunoenzymatique permettant la détection de récepteurs de *Salmonella* par la technique ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) grâce au système automatisé VIDAS®.

Le test est composé : (i) d'un cône (SPR®) à usage unique qui sert à la fois de phase solide et de système de pipetage. L'intérieur du cône est recouvert des protéines spécifiques de récepteurs de *Salmonella* adsorbées sur sa surface ; (ii) d'une cartouche où sont pré-répartis les autres réactifs de la réaction immunologique prêts à l'emploi.

Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode alternative doivent être confirmés, à partir du bouillon d'enrichissement (non chauffé et conservé à 2 - 8°C) dans les 72 heures suivant la fin de l'incubation. Après isolement préalable sur une gélose chromogène sélective de *Salmonella*, suivre l'une des deux procédures suivantes :

- Selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO à partir de colonies isolées (en incluant l'étape de purification)
- Par utilisation d'une galerie d'identification bioMérieux directement à partir de colonies isolées (sans étape de purification)

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé par les options décrites ci-dessus), le laboratoire devra mettre en œuvre 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 2011 sur 379 échantillons de produits dont 49 naturellement contaminés, 141 artificiellement contaminés et 189 non contaminés, appartenant aux catégories suivantes :

- Produits carnés
- Produits laitiers (hors fromages au lait cru)
- Produits végétaux et produits de la mer
- Produits divers (ovoproduits, pâtisseries, etc.)
- Produits d'alimentation animale
- Environnement (hors production primaire)

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 = 177 <sup>(1)</sup>	Déviations positives A+ / R- PD = 7 <sup>(1)</sup>
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 6 <sup>(2)</sup>	Accord négatif A- / R- NA = 189 <sup>(3)</sup>

(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, négatif après confirmation

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

- Exactitude relative : AC = 96,6%
- Spécificité relative : SP = 96,4%
- Sensibilité relative : SE = 96,7%

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 :  
 $(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 96,8\%$

Méthode de référence :  
 $(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 96,3\%$

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

PD = 7, ND = 6, Y = PD + ND = 13 ;  $6 \leq Y \leq 22$ , m = 6, M = 2, donc m > M

**Conclusion**

Les méthodes ne sont pas différentes en terme statistique.

**Essais de conservation des bouillons d'enrichissement (EPT + Supplément Salmonelles 18h) pendant 72 heures à 2-8°C**

Tous les bouillons d'enrichissement pour lesquels les résultats étaient positifs ont été conservés pendant 72h à 2 – 8°C, pour valider la possibilité de différer la réalisation du test VIDAS et des confirmations.

Les résultats obtenus après conservation au froid des bouillons d'enrichissement étaient identiques à ceux obtenus directement après incubation. La conservation au froid n'a pas eu d'incidence sur les résultats.

**NIVEAU DE DETECTION relatif**

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

Des essais ont été effectués en 2011, sur les 6 combinaisons « produit alimentaire/souche » décrites dans le tableau ci-dessous.

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 <sub>50</sub> (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Viande hachée de volaille	<i>Salmonella</i> Hadar	0,7 [0,3 – 1,3]	0,6 [0,3 – 1,1]
Fromage blanc	<i>Salmonella</i> Typhimurium	0,4 [0,3 – 0,8]	0,6 [0,4 – 0,9]
Filet de poisson	<i>Salmonella</i> Kedougou	0,5 [0,3 – 0,9]	0,5 [0,3 – 0,9]
Coule d'œufs	<i>Salmonella</i> Enteritidis	0,5 [0,3 – 0,9]	0,5 [0,3 – 0,8]
Pâté pour animaux	<i>Salmonella</i> Liverpool	0,5 [0,3 - 0,9]	0,8 [0,5 - 1,1]
Eau de process	<i>Salmonella</i> London	0,5 [0,3 - 0,8]	0,4 [0,3 – 0,7]

(3) **LOD<sub>50</sub>** : 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 10<sup>th</sup> December, 2003"

**Conclusion**

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

## INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

### Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- 56 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 57 testées. Une souche *Salmonella* immobile (origine produit carné) n'a pas été détectée.
- L'étude de 30 souches non *Salmonella* a montré une réaction croisée avec une souche de *Citrobacter koseri*.

## PRATICABILITE

### Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
  - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 2 à 6 jours avec la méthode alternative, contre 5 à 7 jours avec 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 2011 avec 16 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de pâté, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Salmonella* Derby aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC/25 g
- 1,2 UFC/25 g
- 10,9 UFC/25 g

Les laboratoires ont testé, par les **deux méthodes**, **8 réplicats** pour **chaque niveau** de contamination, soient 48 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	128	128	112	112	0	0	
1	128	128	112	50	57	62	55
2	128	128	112	0	0	112	112

\* Les résultats de deux laboratoires n'ont pas été pris en compte (les conditions de réception des échantillons n'étaient pas conformes).

### Calculs

- L'exactitude relative est de 89,0%
- La spécificité est de 90,7%
- La sensibilité est de 87,3%

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 interlaboratoire sont inférieurs à ceux obtenus lors de l'étude préliminaire.

Du fait de l'effet combiné d'une matrice alimentaire fortement contaminée en flore annexe (taux supérieur à  $10^8$  UFC/g) et d'une très faible contamination en salmonelles au niveau 1 (taux réel de 1,2 UFC/25g), les pourcentages de sensibilité ont été abaissés pour les deux méthodes, impactant les résultats dans leur ensemble.

### 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	100,0%	100,0%	1,00
L1	78,0%	74,0%	1,06
L2	100,0%	100,0%	1,00

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100,0%	100,0%	1,00
L1	76,0%	75,0%	1,01
L2	100,0%	100,0%	1,00

## Conclusion

La variabilité de la méthode alternative (degré d'accord, concordance, odds ratio) est comparable 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](http://www.afnor-validation.org)