

Contacts:

Stéphanie SAMMARTANO
Ingénieure certification
stephanie.sammartano@afnor.org
Tél : +33 (0)1 41 62 62 39

Jérôme FAYOL
Chargé de clientèle
jerome.fayol@afnor.org
Tél : +33 (0)1 41 62 60 63

Réf.: SSO/JFY/NF102/Clients/Life Technologies/
Avis BT_TaqMan Salmonella enterica_2015-05-22_R2

Objet : Marque NF VALIDATION

Life Technologies Corporation
Thermo Fisher Scientific
Monsieur Ravi Ramadhar
2130 Woodward Street
Austin, TX 78744
Etats-Unis

La Plaine Saint-Denis, le 22 mai 2015

Monsieur,

Comme suite à l'avis positif exprimé le 21 mai 2015 par le Bureau Technique « Microbiologie agroalimentaire » de la marque NF VALIDATION (NF102), j'ai l'honneur de vous annoncer que le **droit d'usage de la marque NF VALIDATION est reconduit** pour la méthode d'analyse suivante :

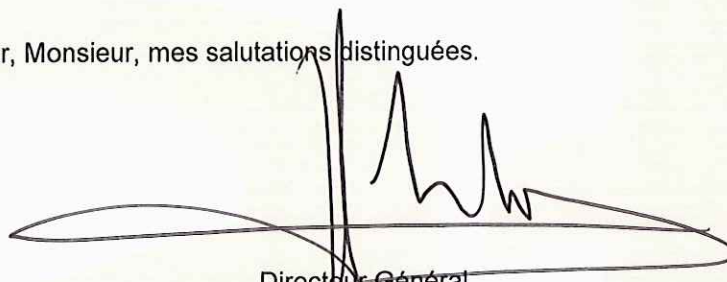
TaqMan *Salmonella enterica*

Certifiée sous le certificat N° ABI 29/01-09/07, avec pour fin de validité le 28-sept.-2019

La méthode est validée pour la recherche de *Salmonella enterica* (groupes I à IV) dans tous les produits d'alimentation humaine et animale, par comparaison à la méthode de référence NF EN ISO 6579 :2002 et selon le protocole NF EN ISO 16140 :2003.

Un courrier complet de conclusions mentionnant d'éventuelles réserves prononcées par le Bureau Technique, vous sera prochainement adressé. Le cas échéant, celles-ci devront être prises en compte sans délai.

Je vous prie d'agréer, Monsieur, mes salutations distinguées.


Directeur Général
Franck LEBEUGLE





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 : ABI 29/01 – 09/07

Date de validation : 28.09.2007
Date de reconduction : 01.07.2011
Fin de validité : 28.09.2015

La Société Life Technologies Corporation
5791 Van Allen Way
Carlsbad, CA 92008-7321, USA

Production site Life Technologies
7 Kingsland Grange
Woolston, Birchwood
Warrington, WA1 4SR, UK

Représentée en Europe par Life Technologies SAS
Route de l'Orme des Merisiers
Immeuble Le Discovery - Parc Technologique
91190 Saint Aubin, France

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

TaqMan® *Salmonella enterica*

Référence du protocole : Part Number 4381939 Rev. E

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine et animale.

RESTRICTIONS

La méthode permet de détecter *Salmonella enterica* (groupes I à VI) et n'est pas adaptée à la détection de *Salmonella bongori* (groupe V).

METHODE DE REFERENCE

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

Directrice Générale
Florence MÉAUX

PRINCIPE DE LA METHODE

Après un enrichissement en eau peptonée et une extraction de l'ADN, la technique de PCR en Temps Réel TaqMan® *Salmonella enterica* permet de coupler une réaction de PCR à sa détection à l'aide d'une sonde oligonucléotidique fluorescente, la sonde TaqMan®. Les résultats sont rendus par un thermocycleur sous forme visuelle.

Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode TaqMan® *Salmonella enterica* doivent être confirmés selon l'une des options suivantes :

- Par les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO à partir de colonies (en incluant l'étape de purification)
- Par l'utilisation de toute autre méthode bénéficiant de la marque NF VALIDATION, de principe différent de celui de la méthode TaqMan® *Salmonella enterica* dont on cherche à confirmer le résultat. Le protocole de détection 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 présomptif 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.

Note 1 : Les thermocycleurs suivants sont inclus dans le protocole validé : 7000, 7300, 7500, 7500 FAST, 7700 et STEP ONE.

Note 2 (Historique de validation) : En juillet 2011, la validation de la méthode TaqMan® *Salmonella enterica* a été reconduite. La méthode n'a pas été modifiée depuis la validation initiale, et le protocole de validation EN ISO 16140 ainsi que la méthode de référence n'ont pas changé. L'étude de sélectivité a été complétée selon les exigences particulières NF 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 2007 sur 333 échantillons de produits dont 60 naturellement contaminés, 95 artificiellement contaminés et 178 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

- Produits carnés
- Produits laitiers
- Ovoproduits
- Produits de la mer
- Aliments pour animaux

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 = 150 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 1 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 4 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 178 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

(3) dont 21 échantillons présumés positifs par la méthode alternative non confirmés

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

- Exactitude relative : **AC = 98,5%**
- Spécificité relative : **SP = 99,4%**
- Sensibilité relative : **SE = 97,4%**

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 :
 $(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 97,4\%$

Méthode de référence :
 $(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 99,4\%$

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

PD = 1, ND = 4 donc Y = PD + ND = 5 et aucun test statistique ne peut être appliqué.

Essais de conservation de l'eau peptonée tamponnée pendant 72 heures à 4°C

En 2007, les bouillons d'enrichissement des échantillons positifs de la méthode alternative ont été conservés à 4°C pendant 72 h et analysés à nouveau.

Sur 151 échantillons ayant donné un résultat positif directement après incubation, deux types de modifications de résultat ont été observés : un positif concordant est devenu négatif discordant et trois résultats négatifs discordants sont devenus positifs concordants.

Le stockage au froid ne modifie pas sensiblement les résultats obtenus immédiatement après incubation.

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 cinq 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 ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Bœuf haché	<i>Salmonella</i> Infantis	0,5 [0,3 – 0,8]	0,4 [0,3 – 0,7]
Poisson cru	<i>Salmonella</i> Saintpaul	0,7 [0,4 – 1,3]	0,5 [0,2 – 1,6]
Coule d'œuf	<i>Salmonella</i> Enteritidis	0,6 [0,2 – 1,6]	0,6 [0,2 – 1,6]
Lait cru	<i>Salmonella</i> Typhimurium	0,5 [0,1 – 1,7]	0,5 [0,1 – 1,7]
Nourriture pour chien	<i>Salmonella</i> Agona	0,3 [0,1 – 1,0]	0,4 [0,1 – 1,1]

(3) LOD₅₀ : estimation du niveau de contamination qui permet d'obtenir une détection positive par la méthode alternative dans 50% des cas. FDA. 2006. *Final Report and Executive Summaries from the AOAC International Presidential Task Force on Best Practices in Microbiological Methodology. Appendix K. Statistics Working Group (Tholen, D. W., D. S. Paulson, B. Jarvis, D. M. Mettler, B. Lombard, K. Newton, M. A. Mozola, and A. D. Hitchins.) Report Part 4a - LOD50.*

Conclusion

Le niveau de détection de la méthode alternative est identique à celui de la méthode de référence : il se situe entre 0,1 et 1,7 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- 56 souches de *Salmonella* (avec exclusion de *Salmonella* Bongori) ont été détectées sur 56 testées.
- L'étude de 35 souches non *Salmonella* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées, et la souche *Salmonella bongori* testée n'a pas été détectée par la méthode TaqMan *Salmonella enterica*.

PRATICABILITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en quatre à six jours avec les méthodes alternative et de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en un jour avec la méthode alternative contre trois 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 quatre à six jours.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2007 avec 14 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 :

- 0 UFC/ 25ml
- 1 – 10 UFC/ 25ml
- 5 – 50 UFC/ 25ml

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	112	112	80	76	79	4	1
1	112	112	80	3	3	77	77
2	112	112	80	0	0	80	80

* Trois laboratoires n'ont pas respecté le protocole de la méthode de référence et un laboratoire a rencontré des contaminations croisées.

Calculs

- L'exactitude relative est de 98,8%
- La spécificité est de 98,1%
- La sensibilité est de 98,1%

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 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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 98,1\%$$

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	97,8%	93,4%	1,05
L1	95,3%	92,5%	1,03
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	91,9%	90,3%	1,02
L1	95,3%	92,5%	1,03
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 <http://nf-validation.afnor.org/>