

Contacts:

Stéphanie SAMMARTANO
Ingénieure certification Senior
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/Europrobe/
Avis BT_Prolongation LUMIPROBE 24 Salmonella_2017-07-04

Objet : Marque NF VALIDATION

EUROPROBE
Madame Nicole MALARRE
Le Gemellyon Nord
57 Bd Vivier Merle
69429 LYON Cedex 03

La Plaine Saint-Denis, le 4 juillet 2017

Madame,

Le droit d'usage de la marque NF VALIDATION de la méthode d'analyse suivante :

LUMIPROBE 24 SALMONELLA ESPECES	Réf. EUR 15/02-11/00
--	-----------------------------

arrivera à expiration le 4 juillet 2017 avant que les résultats de l'étude de reconduction ne puissent être présentés au Bureau Technique "Microbiologie agroalimentaire" de la marque NF VALIDATION (NF102).

C'est pourquoi, sur avis positif du Bureau Technique concerné, je vous accorde une prolongation du droit d'usage de la marque NF VALIDATION pour cette méthode jusqu'au 24 novembre 2017.

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


Directeur Général
Franck LEBEUGLE



Contacts:

Stéphanie SAMMARTANO
Ingénieure certification Senior
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/Europrobe/
Avis BT_Prolongation LUMIPROBE 24 Salmonella_2017-05-19

Objet : Marque NF VALIDATION

EUROPROBE
Madame Nicole MALARRE
Le Gemellyon Nord
57 Bd Vivier Merle
69429 LYON Cedex 03

La Plaine Saint-Denis, le 19 mai 2017

Madame,

Le droit d'usage de la marque NF VALIDATION de la méthode d'analyse suivante :

LUMIPROBE 24 SALMONELLA ESPECES	Réf. EUR 15/02-11/00
--	-----------------------------

arrivera à expiration le 29 mai 2017 avant que les résultats de l'étude de reconduction ne puissent être présentés au Bureau Technique "Microbiologie agroalimentaire" de la marque NF VALIDATION (NF102).

C'est pourquoi, sur avis positif du Bureau Technique concerné, je vous accorde une prolongation du droit d'usage de la marque NF VALIDATION pour cette méthode jusqu'au 4 juillet 2017.

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


Directeur Général
Franck LEBEUGLE



Contacts:

Stéphanie SAMMARTANO
Ingénieure certification Senior
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/Europrobe/
Avis BT_Prolongation LUMIPROBE 24 Salmonella_2016-11-22

Objet : Marque NF VALIDATION

EUROPROBE
Madame Nicole MALARRE
Le Gemellyon Nord
57 Bd Vivier Merle
69429 LYON Cedex 03

La Plaine Saint-Denis, le 22 novembre 2016

Madame,

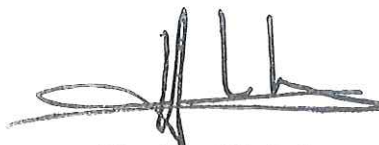
Le droit d'usage de la marque NF VALIDATION de la méthode d'analyse suivante :

LUMIPROBE 24 SALMONELLA ESPECES	Réf. EUR 15/02-11/00
--	-----------------------------

arrivera à expiration le 29 novembre 2016 avant que les résultats de l'étude de reconduction ne puissent être présentés au Bureau Technique "Microbiologie agroalimentaire" de la marque NF VALIDATION (NF102).

C'est pourquoi, sur avis positif du Bureau Technique concerné, je vous accorde une prolongation du droit d'usage de la marque NF VALIDATION pour cette méthode jusqu'au 29 mai 2017.

Je vous prie d'agréer, Madame, 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 : EUR 15/02 – 11/00

Date de validation :	29.11.2000
Date d'extension :	07.03.2002
Dates de reconduction :	08.04.2005*
	18.05.2009
	29.11.2012
Fin de validité :	29.11.2016

** Le protocole NF EN ISO 16140 a été mis en œuvre lors des reconductions en 2005 pour l'étude préliminaire et en 2008 pour l'étude interlaboratoire*

La Société **EUROPROBE SA**
(siège social) Le Gemellyon Nord
57, Bd Vivier Merle
F– 69429 LYON Cedex 03

Distributeur **EURALAM**
Le Gemellyon Nord
57, Bd Vivier Merle
F – 69429 LYON Cedex 03

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

LUMIPROBE 24 SALMONELLA ESPECES

Référence des protocoles : FTST-V4-13 (version tubes) et FTSP-V4-13 (version microplaques)

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine et animale.

RESTRICTIONS

Aucune.

METHODE DE REFERENCE

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

**Directrice Générale
Florence MÉAUX**



PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode *LUMIPROBE 24 SALMONELLA ESPECES* est un test associant un enrichissement en milieux de culture spécifique et une étape de détection par hybridation de sondes nucléiques en phase solide, rapide et spécifique des Salmonelles. L'ARNr de la bactérie cible, libéré par lyse, capturé par un oligonucléotide immobilisé sur un support coaté, est hybridé avec un deuxième oligonucléotide marqué. La formation des hybrides est révélée par une réaction de chemiluminescence.

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 sélectif sur lequel le test *LUMIPROBE 24 SALMONELLA ESPECES* a été réalisé selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification).

En cas de résultats discordants (positif présomptif 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.

Le protocole standard pour toutes matrices d'alimentation humaine et animale est le protocole validé dans le cadre de la marque NF VALIDATION.

NOTE (Historique de validation)

1/ La reconduction de la validation de 2005 a pris en compte les modifications suivantes par rapport à la première validation en 2000 (ovoproduits) étendue en 2002 (extension à tous produits) :

- Nouvelle méthode de référence EN ISO 6579 (2002) en remplacement de la norme EN 12824
- Nouveau protocole de validation normalisé EN ISO 16140

Certains essais effectués en 2000 et 2002 ont été conservés (notamment l'intégralité de l'étude interlaboratoire réalisée selon les exigences AFNOR révision 7) et l'étude préliminaire a été complétée sur les points suivants : exactitude, sensibilité et spécificité relatives, niveau de détection relatif, inclusivité.

2/ En mai 2009, le droit d'usage de la méthode a été reconduit. Depuis la dernière validation, la méthode de référence n'a pas changé et la méthode alternative n'a pas été modifiée. L'étude interlaboratoire a été refaite en accord avec les exigences de l'EN ISO 16140. L'étude préliminaire a également été complétée, pour la catégorie produits laitiers, sur les paramètres exactitude, spécificité et sensibilité relatives, le niveau de détection relatif, et l'inclusivité. La présente attestation reprend l'ensemble de ces résultats.

3/ En novembre 2012, la validation de la méthode *LUMIPROBE 24 SALMONELLA ESPECES* a été reconduite. La méthode alternative n'a pas été modifiée, et la méthode de référence et le protocole de validation restent inchangés. Des compléments d'étude de sélectivité ont été réalisés conformément aux exigences spécifiques de la marque NF VALIDATION. Les résultats, conformes à ceux attendus, sont reportés dans cette 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 2005 lors de la 1^{ère} étude de reconduction, puis complétés en 2008 dans le cadre de la 2^{ème} étude de reconduction, sur au total 334 échantillons de produits dont 51 naturellement contaminés, 110 artificiellement contaminés et 173 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

- Produits carnés,
- Produits de la mer et végétaux,
- Produits laitiers,
- Ovoproduits,
- Alimentation animale

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 = 151 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 3 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 7 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 173 ⁽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 = 97,0 %**
- Spécificité relative : **SP = 98,3 %**
- Sensibilité relative : **SE = 95,6 %**

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 :
$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 95,6 \%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 98,1 \%$

Analyse des discordants (selon annexe F de la norme NF EN ISO 16140) :

PD = 3, ND = 7 ; Y = PD + ND = 10 ; $6 \leq Y \leq 22$; m = 3, M = 1 ; donc m > M

Conclusion

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 2005 lors de la 1^{ère} étude de reconduction, puis complétés en 2008 dans le cadre de la 2^{ème} étude de reconduction, sur un total de 7 combinaisons « produits alimentaire/souche » décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments :

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Produits carnés, • Produits de la mer et végétaux, • Produits laitiers, | <ul style="list-style-type: none"> • Ovoproduits, • Alimentation animale |
|---|--|

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
<i>Essais réalisés en 2005</i>			
Œufs entiers	<i>Salmonella</i> Enteritidis S38	0,6 [0,4 - 1,0]	0,8 [0,5 – 1,2]
Viande hachée	<i>Salmonella</i> Typhimurium S15	1,6 [1,0 – 2,4]	1,3 [1,0 – 1,8]
Lait cru	<i>Salmonella</i> Dublin S59	8,2 [5,6 – 11,9]	1,9 [1,1 – 3,4]
Saumon fumé	<i>Salmonella</i> Enteritidis S63	1,0 [0,6 – 1,7]	1,0 [0,6 – 1,7]
Granulés pour rongeurs	<i>Salmonella</i> spp S65	0,6 [0,4 – 1,1]	1,0 [0,6 – 1,7]
<i>Compléments réalisés en 2008</i>			
Lait cru	<i>Salmonella</i> Dublin	0,8 [0,6 – 1,2]	0,9 [0,7 – 1,3]
Lait cru	<i>Salmonella</i> Newport	0,6 [0,5 – 0,8]	0,6 [0,4 – 0,8]

(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 se situe entre 0,4 et 11,9 UFC/25 g.
Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,4 et 3,4 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- **Inclusivité :**

- Etude 2000 et 2002 : 50 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 50 testées.
- Etude 2005 (1^{ère} reconduction) : Les 6 souches de *Salmonella* (1 Typhi, 2 Paratyphi A, 2 Paratyphi B, 1 Paratyphi C) testées ont été détectées.
- Etude 2008 (2^{ème} reconduction) : 14 autres souches de *Salmonella* ont été détectées sur 17 testées.

Trois souches de *Salmonella* Gallinarum n'ont pas été initialement détectées. Pour une contamination initiale de 50 à 70 UFC/225 ml, le seuil de détection de la méthode LUMIPROBE 24 *Salmonella* ESPECES n'a pas été atteint pour ce sérovar, à croissance reconnue plus lente que les autres sérovars de *Salmonella*.

- Etude 2012 (3^{ème} reconduction) : 10 autres souches de *Salmonella* (dont 3 variants immobiles de *Salmonella* Typhimurium) ont été détectées sur 10 testées.

- **Exclusivité :**

- Etude 2000 et 2002 :

L'étude de 30 souches n'appartenant pas à l'espèce *Salmonella* a mis en évidence la présence de réactions croisées avec 2 souches de *Citrobacter diversus* (*C. diversus* 140 et *C. diversus* CIP 8294) et 1 souche d'*Enterobacter sakazakii* 95. Ces réactions croisées n'ont pas été retrouvées sur coule d'œuf ; 7 autres souches d'*E. sakazakii* testées ont donné des réponses négatives.

Deux souches de *Citrobacter freundii* (23 et 175) et une souche d'*Enterobacter agglomerans* (II) ont donné une réaction croisée uniquement par test sur BHI, elles n'ont pas été détectées par le protocole propre à la méthode LUMIPROBE (RM et Rappaport Vassiliadis).

- Etude 2012 (3^{ème} reconduction) : L'étude de 4 souches n'appartenant pas à l'espèce *Salmonella* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées.

PRATICABILITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 4 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 5 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 5 jours.
- **Formation du personnel** : 1 journée pour un opérateur formé aux techniques classiques de microbiologie.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2008 avec 12 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de lait pasteurisé, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Salmonella* Enteritidis aux 3 niveaux suivants :

- niveau 0 : 0 UFC/ml
- niveau 1 : 3 UFC/ml
- niveau 2 : 30 UFC/ml

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	96	96	88	87	88	1	0
1	96	96	88	6	12	82	76
2	96	96	88	1	1	87	87

* Les résultats d'un laboratoire collaborateur ont dûs être exclus car le protocole de la méthode alternative n'a pas été respecté.

Calculs

- L'exactitude relative est de **92 %**
- La spécificité est de **100%**
- La sensibilité est de **92,6%**

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 :

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

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 92\%$$

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	78	76	1,10
L2	98	98	1,00

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

Niveau de contamination	Degré d'accord %	Concordance %	COR
L0	98	98	1,00
L1	90	87	1,30
L2	98	98	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