

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/BioControl Systems/
Avis BT_TAG24 Salmonella_2015-05-22_R2

Objet : Marque NF VALIDATION

BioControl Systems
Monsieur Philip FELDSINE
12822 SE 32nd Street
Bellevue, WA 98005
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 :

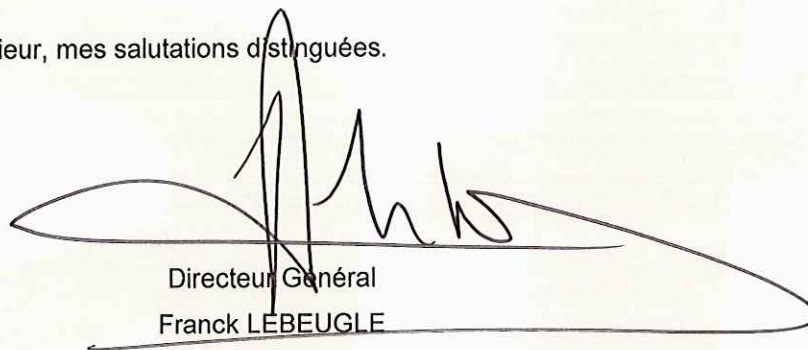
TRANSIA ADDITIVE *Salmonella* Gold 24h

Certifiée sous le certificat N° TRA 02/09-07/07, avec pour fin de validité le 02-juil.-2019

La méthode est validée pour la recherche de *Salmonella* spp. 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



Contact :

Stéphanie SAMMARTANO
stephanie.sammartano@afnor.org
Tel : +33 (0)1 41 62 62 39
Fax : + 33 (0)1 49 17 90 86

Ref. : SSO/NF102/Clients/BioControl Systems/
Avis BT décembre 2011 Reconduction TAG 24 Salmonella

BIOCONTROL SYSTEMS
Monsieur Christophe BAUER
37, Gratteloup
45490 LORCY
France

Objet : NF VALIDATION

Saint-Denis, le 5 décembre 2011

Monsieur,

Comme suite à l'avis positif exprimé le 1^{er} décembre 2011 par le Bureau Technique "Microbiologie" de la marque NF VALIDATION, dans son application à l'agroalimentaire, j'ai l'honneur de vous annoncer que le **droit d'usage de la marque NF VALIDATION est reconduit pour la méthode alternative d'analyse suivante :**

TAG 24 Salmonella

Pour la détection de *Salmonella* spp dans les produits d'alimentation humaine et animale

Certifiée sous le n° TRA 02/09 – 07/07, avec pour fin de validité : 2-Juil.-2015

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

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



Directrice Générale
Florence MÉAUX





**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 : TRA 02/09 – 07/07

**Date de validation : 02.07.2007
Fin de validité : 02.07.2011**

La Société
(siège social et
site de production)

BioControl Systems Inc.
12822 SE 32nd Street
Bellevue, WA 98005
USA

Distributeur

BioControl Systems France
Centre d'affaires DMCI
4, Quai des Etroits
69005 LYON
FRANCE

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

TAG 24 Salmonella

Références du protocole :

- TAG 24 *Salmonella* : NOT COM 1800B 08/07
- TRANSIA PLATE *Salmonella* Gold : NOT COM 510L 08/07 (1 plaque)
et NOT COM 710M 08/07 (10 plaques)

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine et animale.

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Le protocole complet de la méthode appliqué à des cultures pures de *Salmonella* peut ne pas fonctionner (cf. paragraphe Inclusivité/exclusivité).

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

La méthode TAG 24 *Salmonella* est basée sur la combinaison du test TRANSIA PLATE *Salmonella* Gold (certifié AFNOR VALIDATION référence TRA 02/08 – 03/01) et du supplément TRANSIA ADDITIVE *Salmonella* Gold 24 heures (TAG 24)

Après un enrichissement rapide en eau peptonée tamponnée supplémentée avec l'additif TAG 24, un ensemencement de 1 ml a lieu dans 10 ml de bouillon cœur cervelle (BCC) supplémenté avec l'additif TAG 24, suivi d'une incubation 4 à 5 heures à 41,5°C.

Puis le test TRANSIA PLATE *Salmonella* Gold est réalisé. Il est basé sur une réaction immunoenzymatique de type sandwich utilisant :

- Une plaque de microtitration sensibilisée avec des anticorps spécifiques de *Salmonella*,
- Des réactifs prêts à l'emploi

La lecture de la microplaque se fait à l'aide d'un spectrophotomètre à une densité optique de 450 nm.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs ou douteux à l'issue de la méthode alternative TAG 24 *Salmonella* doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

- à partir du bouillon d'enrichissement BCC/TAG 24 non chauffé et isolement sur deux géloses sélectives, selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification).
- avec une autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION, de principe différent de la méthode TAG 24 *Salmonella*, en suivant les instructions décrites dans la notice du fabricant.

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.

NOTE

La méthode TAG 24 *Salmonella* comporte deux protocoles : un protocole général avec incubation EPT/TAG 24 pendant 18-20 heures à 37°C, et un protocole spécifique "produits carnés" avec incubation EPT/TAG 24 pendant 18-20 heures à 41,5°C.

Seul le protocole général a été testé lors de l'étude interlaboratoire.

La conservation du bouillon BCC/TAG 24 à 2–8°C pendant 48 heures avant réalisation du test et confirmation a été testée durant cette étude.

Les résultats de l'étude d'exclusivité réalisée en 2004, lors de la Validation de la méthode TRANSIA PLATE *Salmonella* Gold, ont été repris.

L'étude d'inclusivité a démontré que les agents inhibiteurs présents dans le supplément TAG 24, sont trop actifs sur quelques cellules de *Salmonella* en culture pure. L'ajout de lait UHT ayant un effet protecteur des cellules de *Salmonella*, a été accepté par le Bureau Technique AFNOR VALIDATION.

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 2006 et 2007 (essais complémentaires protocole spécifique pour la catégorie produits carnés) sur 334 échantillons de produits dont 43 naturellement contaminés, 119 artificiellement contaminés et 172 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits laitiers, produits carnés, divers (dont pâtisseries, œufs et dérivés et plats cuisinés), produits de la mer et végétaux et aliments pour animaux.

Tous les échantillons ont été analysés **en simple** par les **deux méthodes**.

Protocole spécifique pour les produits carnés et protocole général pour les autres catégories :

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 = 143 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 10 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 9 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 172 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont aucun résultat positif TRANSIA PLATE *Salmonella* Gold non confirmé

(3) dont un résultat TRANSIA PLATE *Salmonella* Gold douteux, et non confirmé positif et deux résultats faux positifs non confirmés

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

- Exactitude relative : **AC** = 94,3%
- Spécificité relative : **SP** = 94,5%

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

- Sensibilité relative : **SE** = 94,1%

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 94,4\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 93,8\%$$

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

$$PD = 9, ND = 10 \text{ donc } Y = PD + ND = 19 ; 6 \leq Y \leq 22 \quad m = 9, M = 4 \quad \text{donc } m > M$$

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 2007, sur les cinq combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : Produits laitiers, produits carnés, divers (dont pâtisseries, œufs et dérivés et plats cuisinés), produits de la mer et végétaux et aliments pour animaux.

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
Viande hachée de volaille (protocole spécifique)	<i>Salmonella</i> Hadar	0,3 [0,2 – 0,6]	0,4 [0,2 – 0,7]
Lait cru	<i>Salmonella</i> Typhimurium	0,7 [0,4 – 1,5]	0,7 [0,4 – 1,2]
Coule d'œufs	<i>Salmonella</i> Enteritidis	0,6 [0,4 – 0,8]	0,6 [0,4 – 1,0]
Filet de poisson	<i>Salmonella</i> Virchow	0,4 [0,3 – 0,8]	0,6 [0,3 – 1,0]
Pâté pour chien	<i>Salmonella</i> Senftenberg	0,5 [0,3 – 0,7]	0,5 [0,3 – 0,7]

(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 Use 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 1,5 UFC/25 g.

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

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE (2004 et 2007)

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

Note : l'enrichissement de la méthode TAG 24 a été optimisé par le fabricant pour assurer une détection plus rapide des salmonelles. En particulier, la sélectivité du préenrichissement a été augmentée. Cette forte sélectivité peut être difficile à supporter par des cellules en culture pures, alors que les salmonelles "protégées" par une matrice alimentaire survivent à la pression sélective. C'est pourquoi l'étude d'inclusivité a été réalisée **en présence de lait UHT**, par dérogation par rapport à la norme EN ISO 16140.

Dans le cas de l'utilisation de matrices autres que celle testées dans l'étude, vérifier que celles-ci fonctionnent.

- 50 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 50 testées.

L'étude d'exclusivité de la méthode TRANSIA PLATE *Salmonella* Gold a été réalisée en 2004, les différentes souches négatives ont été cultivées en eau peptonée tamponnée. Cette étude a été réalisée à partir d'un bouillon non sélectif. Les résultats sont donc repris pour l'attestation de la méthode TAG 24 *Salmonella* :

- L'étude de 30 souches non *Salmonella* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats** :
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en deux à trois jours avec la méthode alternative contre trois à quatre jours avec la méthode de référence.

- L'obtention des résultats **négatifs** se fait en un jour avec la méthode alternative contre trois à sept 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 deux à trois jours.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2007 avec 13 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 UFC / 25 ml
- niveau 3 UFC / 25 ml
- niveau 30 UFC / 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	104	88	88	87	88	1	0
1	104	88	88	2	3	86	85
2	104	88	88	0	0	88	88

* Un laboratoire a reçu les échantillons hors délai et un laboratoire a reçu les échantillons à une température supérieure aux exigences.

Calculs

- L'exactitude relative est de 97,7 %
- La spécificité est de 100 %
- La sensibilité est de 98,3 %

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 98,5 \%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 99,2 \%$$

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 :

$$\text{COR} = \frac{\text{degré d'accord} \times (100 - \text{concordance})}{\text{concordance} \times (100 - \text{degré d'accord})}$$

Le tableau suivant indique les valeurs pour la **méthode alternative** :

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1,00
L1	94%	93,4%	1,12
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	98%	97,7%	1,00
L1	96%	95,5%	1,13
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 www.afnor-validation.org