

Contacts:

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

Audrey VERNEL
Chargée de clientèle
audrey.vernel@afnor.org
Tél : +33 (0)1 41 62 60 63

Réf.: SSO/AYV/NF102/Clients/ADNucleis/
Avis BT_HQS Salmonella Sybr_2014-03-20_(R1)

Objet : Marque NF VALIDATION

SAS ADNucleis
Docteur Michel FRANCK
30 Chemin de Mouilles
69290 GREZIEU LA VARENNE

La Plaine Saint-Denis, le 26 mars 2014

Monsieur,

Comme suite à l'avis positif exprimé le 20 mars 2014 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 alternative d'analyse suivante :

HQS *Salmonella* spp Sybr

Validée pour la détection des *Salmonella* dans tous les produits d'alimentation humaine

Certifiée sous le n° d'attestation ADN 33/03-04/10, avec pour fin de validité le 2-avril-2018

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 : ADN 33/03 – 04/10

Date de validation : 02.04.2010

Fin de validité : 02.04.2014

La société
(siège social)

ADNucleis
30 Chemin des Mouilles
69290 Grézieu La Varenne

Site de production

ADNucleis
3 routes des Pierres Blanches
69290 Grézieu La Varenne

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

HQS *Salmonella* spp Sybr

Référence du protocole : Avril 2010 v 02.01

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine.

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Lait cru en mode incubation courte (12h).

METHODE DE REFERENCE

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

A handwritten signature in black ink, appearing to be "FM", with a long horizontal line extending to the right.

**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 - www.afnor-validation.org

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode HQS *Salmonella* spp Sybr repose sur le principe de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) basée sur la technique SYBR® Green. Elle permet la détection des *Salmonella* spp après enrichissement de 12 à 24 heures à 37±1°C en eau peptonnée tamponnée.

Le kit est constitué d'un mélange réactionnel d'extraction des ADN génomiques, d'un kit de purification des ADN et de tubes de réaction PCR destinés à l'obtention d'amplicons spécifiques de *Salmonella* spp. L'interprétation des résultats se fait à partir des graphiques et données de la qPCR.

Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode alternative doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

- Selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO à partir de colonies (en incluant l'étape de purification) à partir des bouillons enrichissement 12h à 24h.
- Utilisation de toute autre méthode certifiée NF VALIDATION, de principe différent de celui de la méthode HQS *Salmonella* spp Sybr. 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 les options décrites ci-dessus), le laboratoire devra mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

Note 1 : La méthode HQS *Salmonella* spp Sybr est validée pour l'analyse de tous produits d'alimentation humaine (hors laits crus) en 12 heures à 24 heures d'enrichissement et pour l'analyse des laits crus en 24 heures d'enrichissement.

Note 2 : La méthode HQS *Salmonella* spp Sybr est certifiée NF VALIDATION pour son utilisation avec les thermocycleurs suivants : ABI 7000/7300/7500/7900, RotorGene, Realplex et MX3005P.

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 318 échantillons de produits dont 39 naturellement contaminés, 129 artificiellement contaminés et 150 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes : produits carnés, produits laitiers, produits de la mer, produits végétaux et divers.

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

Tous produits (hors laits crus) « Lecture à 12 heures »

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 = 157 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 0 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 1 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 140 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

(3) dont 3 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

Tous produits (dont laits crus) « Lecture à 24 heures »

Lecture 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 = 166 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 0 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 2 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 150 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) dont 0 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

(3) dont 8 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

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

	Tous produits (hors laits crus) « Lecture à 12h »	Tous produits (dont laits crus) « Lecture à 24h »
Exactitude relative : AC %	99,7%	99,4%
Spécificité relative : SP %	100%	100%
Sensibilité relative : SE %	99,4%	98,8%

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

Au cours de cette évaluation la méthode alternative n'a présenté aucun positif confirmé en plus des positifs identifiés par la méthode de référence, il n'ya donc pas lieu de recalculer la sensibilité.

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

Tous produits (hors laits crus) « Lecture à 12 heures »

PD = 0, ND = 1, soit $Y = PD + ND = 1$; $Y < 6$: aucun test statistique n'est disponible;

Tous produits (dont laits crus) « Lecture à 24 heures »

PD = 0, ND = 2, soit $Y = PD + ND = 2$; $Y < 6$: aucun test statistique n'est disponible

Conclusion

Les méthodes ne sont pas différentes en terme statistique.

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 5 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : produits carnés, produits laitiers, produits de la mer, produits végétaux et divers.

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 (Lectures à 12h et 24h)	Méthode de référence
Steak haché	<i>Salmonella</i> Hadar	0,3 [0,2 – 0,4]	0,3 [0,2 – 0,4]
Lait cru	<i>Salmonella</i> Typhimurium	0,4 [0,3 – 0,7]	0,4 [0,3 – 0,7]
Saumon fumé	<i>Salmonella</i> Virchow	0,4 [0,3 – 0,6]	0,4 [0,3 – 0,6]
Jus de pomme	<i>Salmonella</i> Saintpaul	0,4 [0,2 – 0,6]	0,4 [0,2 – 0,6]
Coule d'œuf	<i>Salmonella</i> Enteritidis	0,4 [0,3 – 0,7]	0,4 [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 (lectures à 12h et à 24h) est identique à celui de la méthode de référence et se situe entre 0,2 et 0,7 UFC/25g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en œuvre de la méthode alternative seulement

- Sur 78 souches de *Salmonella* spp testées, 75 ont été détectées. Trois souches ont donné des résultats négatifs à la fois par la méthode HQS *Salmonella* spp Sybr et par la méthode de référence : de *S. Anatum*, *S. Gallinarum* et *S. Illa48*.
- L'étude de 42 souches non *Salmonella* spp 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 5 à 7 jours avec la méthode alternative, comme 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 5 à 7 jours.
- **Formation du personnel :** Il faut entre 1 journée et 1 semaine pour former à la méthode un technicien de microbiologie inexpérimenté en biologie moléculaire, sachant que le niveau de formation initiale du technicien est de type BAC+2.
- **Maintenance des thermocycleurs :** Les appareils doivent être maintenus selon les recommandations du fabricant. Dans l'exercice quotidien, il convient d'intégrer dans chaque série un témoin positif permettant de suivre une carte de contrôles ainsi qu'un témoin mix afin de prévenir une éventuelle contamination. Le suivi des Tmi et des cti permet de valider le bon fonctionnement du thermocycleur. Un décalage vers des valeurs plus élevées est signe d'un dysfonctionnement potentiel du thermocycleur.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2009 avec 10 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:

- 0 UFC/25ml
- 3 UFC/25ml
- 30 UFC/25ml

Les laboratoires ont testé, par la **méthode de référence** et la **méthode alternative** (en 16 heures d'incubation), **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	88	88	88	88	0	0	
1	88	88	88	17	18	71	70
2	88	88	88	0	0	88	88

Calculs

- L'exactitude relative est de 99,6 %
- La spécificité est de 100,0 %
- La sensibilité est de 93,7 %

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 99,3 \%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 100,0 \%$$

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	81,2 %	77,8 %	1,24
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	82,2 %	79,8 %	1,17
L2	100,0 %	100,0 %	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