



**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
Fin de validité :	28.09.2011

La Société Applied Biosystems S.A.
25 avenue de la baltique
(siège social) 91943 COURTABOEUF CEDEX
France

Site de production Applied Biosystems
Lingley House
120 Birchwood boulevard
Warrington, Cheshire, WA3 7QH

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

TaqMan® *Salmonella*

Référence du protocole : 128TN01-01 : Protocole de détection de *Salmonella* par PCR en temps réel TaqMan®

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine et animale

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune

METHODE DE REFERENCE

Norme NF EN ISO 6579 (2002): Méthode horizontale pour la détection des *Salmonella spp*

**Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN**

AFNOR Certification

Siège : 11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France
Bureaux : 116, avenue Aristide Briand – BP 40 – 92224 Bagneux Cedex 6 – France
Tél +33 (0)1 46 11 37 00 – Fax +33 (0)1 46 11 39 40
certification@afaq.afnor.org - www.afnor-validation.org

PRINCIPE DE LA METHODE

Après un enrichissement en eau peptonée et une extraction de l'ADN, la technique de PCR en Temps Réel TaqMan® 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 AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode alternative doivent être confirmés selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN, l'ISO ou l'AFNOR (en incluant l'étape de purification) ou par l'utilisation de toute autre méthode bénéficiant de la marque AFNOR Validation, de principe différent de celui de la méthode validée dont on cherche à confirmer le résultat.

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 :

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

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 laitiers, produits carnés, ovoproduits, produits de la mer et 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%**

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

- Sensibilité relative : **SE = 97,4%**

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 :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 99,4\%$$

Conclusion

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.

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, ovoproduits, produits de la mer 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 :

		Niveau de détection relatif LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
Matrice	Souche	Méthode alternative	Méthode de référence
Bœuf haché	<i>Salmonella infantis</i>	0,5 [0,3 – 0,8]	0,4 [0,3 – 0,7]
Poisson cru	<i>Salmonella saintpaul</i>	0,7 [0,4 - 1,3]	0,5 [0,2 - 1,6]
Coule d'œuf	<i>Salmonella enteritidis</i>	0,6 [0,2 - 1,6]	0,6 [0,2 - 1,6]
Lait cru	<i>Salmonella typhimurium</i>	0,5 [0,1 - 1,7]	0,5 [0,1 - 1,7]
Nourriture pour chien	<i>Salmonella agona</i>	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

"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 0,1 et 1,7 UFC/25 g.

Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,1 et 1,7 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- 56 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 56 testées.
- L'étude de 36 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 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 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 :

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

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 AFAQ AFNOR Certification
toute réclamation concernant les performances de la méthode validée

AFAQ AFNOR Certification tient à votre disposition
un document de synthèse des études préliminaire et collaborative