



**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 : BRD 07/06 – 07/04

Date de validation :	01.07.2004
Dates d'extension :	24.05.2007
	28.09.2007
	25.09.2008
	26.01.2009
	05.02.2010
Date de reconduction :	27.11.2008
Fin de validité :	01.07.2012

La Société
(siège social, distributeur
et site de production)

BIO-RAD
3 Boulevard Raymond Poincaré
92430 MARNES LA COQUETTE
FRANCE

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

iQ-Check™ Salmonella II (réf. 357-8123)

Référence du protocole : 808463 – Rev. C

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine et animale et échantillons d'environnement (hors échantillons de production primaire).

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune.

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

PRINCIPE DE LA METHODE

Le test iQ-Check *Salmonella* II repose sur l'amplification génique et les détections par la technique PCR en temps réel. Il utilise des amorces et une sonde d'ADN spécifiques de *Salmonella spp.* Après les étapes de préenrichissement (et d'enrichissement si nécessaire), la lyse des bactéries libère l'ADN bactérien, puis les étapes d'amplification et de détection ont lieu dans un thermocycleur. A l'issue de la réaction, une fluorescence est émise et mesurée directement par le thermocycleur. Le logiciel associé à l'appareil analyse les résultats qui sont visualisés sous forme de courbes à interpréter.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode iQ-Check *Salmonella* II doivent être confirmés de l'une des manières suivantes :

- Selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification), en repartant du bouillon d'enrichissement d'eau peptonée tamponnée.
- En mettant en œuvre toute autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION de principe différent de la méthode iQ-Check *Salmonella* II, et en respectant les spécifications décrites dans la notice du test.

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé au moyen d'une des deux options décrites ci-dessus), le laboratoire devra mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

NOTE (Historique de validation)

1/ Le test iQ-Check *Salmonella* II comprend un **protocole général (Standard I)**. En cas d'inhibition, l'utilisateur a deux solutions : la réalisation d'une **dilution au dixième** ou bien le recours à un **protocole alternatif** (non applicable aux échantillons de l'environnement) proposé par le fabricant et décrit dans la notice technique. Ce protocole alternatif, testé lors de l'étude préliminaire de validation en 2004, a été conservé, et reste valable uniquement avec un protocole standard.

2/ L'étude d'extension de mai 2007 fait suite aux modifications suivantes apportées à la méthode iQ-Check *Salmonella* II :

- Mise en œuvre d'un deuxième protocole d'extraction d'ADN plus rapide et plus simple
- Raccourcissement du temps d'enrichissement (18 heures \pm 2 heures) pour le protocole Standard I
- Modification du mélange réactionnel d'amplification et du réactif de lyse

Une nouvelle étude préliminaire a donc été réalisée avec les deux protocoles suivants :

- **Protocole Standard I**, 18 heures \pm 2 heures
- **Protocole Simplifié I** en microplaques, 21 heures \pm 1 heure

L'étude interlaboratoire n'a pas été refaite, elle avait été réalisée en 2004 avec le protocole général.

3/ Des essais internes complémentaires ont été réalisés en 2007 et examinés par le bureau technique AFNOR VALIDATION, en vue de comparer deux nouveaux thermocycleurs (iQTM5 et MiniOpticonTM) avec l'un des thermocycleurs initialement acceptés (Chromo4TM).

Ces essais ne sont pas détaillés dans la présente attestation.

Les **quatre versions des thermocycleurs** (Chromo4TM, iCycler iQTM, iQTM5 et MiniOpticonTM) sont à présent utilisables dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION.

4/ En septembre 2008, l'étude d'extension a porté sur l'ajout de deux nouveaux protocoles spécifiques pour les matrices suivantes :

- **Protocole Standard II**, spécifique pour les viandes crues, en 10 heures \pm 2 heures. L'étude préliminaire a été réalisée dans son intégralité, sauf pour l'exclusivité.
- **Protocole Simplifié II**, spécifique aux viandes crues de bœuf en 20 heures \pm 1 heure (impliquant l'utilisation de billes de broyage). L'ensemble des paramètres de l'étude préliminaire ont été testés, excepté inclusivité/exclusivité.

5/ En novembre 2008, lors de la **reconduction** de la méthode et du passage du kit à la version II, une nouvelle étude interlaboratoire a été menée à partir du protocole Simplifié I en tubes conformément aux exigences de la norme EN ISO 16140.

5/ En janvier 2009, une nouvelle étude a permis d'étendre la validation à l'utilisation d'une **nouvelle version du logiciel Opticon Monitor™** intégrant, en plus de la possibilité d'analyse manuelle, une option de retraitement automatique des résultats.

Des tests, effectués en interne et par tierce partie, ont été réalisés à partir du protocole d'enrichissement en eau peptonée tamponnée, suivi de la mise en œuvre du protocole standard I. Par ailleurs, toutes les PCR ont été réalisées par Chromo4™, puis traitées en parallèle à la fois par analyse manuelle et par analyse automatique du logiciel Opticon Monitor™.

Les essais ont permis de démontrer que les traitements automatique et manuel des échantillons ont donné les mêmes résultats.

L'ensemble de ces résultats n'est pas détaillé dans la présente attestation.

5/ En février 2010, les extensions suivantes ont été validées par le bureau technique AFNOR VALIDATION :

- Modifications de l'étape d'extraction, avec utilisation d'un nouveau format de consommable plastique « **plaque Deepwell** » (en plus du format « tube » déjà validé).

Des tests effectués en interne ont permis de conclure que ces modifications n'avaient pas d'impact sur les résultats rendus.

- Utilisation du thermocycleur **CFX96™** et son logiciel **CFX Manager™**, et pilotage du MiniOpticon™ par le logiciel CFX Manager™.

Des essais réalisés en interne ont permis de conclure que les résultats obtenus avec ces nouveaux équipements étaient équivalents à ceux obtenus avec les automates et logiciels déjà validés.

L'ensemble de ces résultats n'apparaît pas dans la présente 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** et **2008** sur au total 582 échantillons de produits dont 64 naturellement contaminés, 219 artificiellement contaminés et 299 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

- Produits carnés
- Produits laitiers
- Produits de la pêche et produits végétaux
- Ovoproduits
- Alimentation animale
- Prélèvements d'environnement

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

L'étude a porté sur le protocole Standard I, le protocole Simplifié I, le protocole Standard II (spécifique pour viandes crues) et le protocole Simplifié II (spécifique pour viandes crues de boeuf).

Les tableaux de résultats sont présentés ci-après.

Protocole Standard I (2007)

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 = 191 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 3 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 5 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 228 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

(3) dont 6 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

Protocole Simplifié I (2007)

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 = 188 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 3 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 8 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 228 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

(3) dont 20 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

Protocole Standard II (spécifique aux viandes crues) (2008)

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 = 51 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 0 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 1 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 37 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

(3) dont 1 échantillon présumés positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

Protocole Simplifié II (spécifique aux viandes crues de bœuf) (2008)

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 = 31 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 0 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 1 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 34 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

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

Des essais ont été effectués en 2004 sur 362 échantillons de produits appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes (hors échantillons d'environnement, pour lesquels le protocole alternatif n'est pas applicable) :

- Produits carnés
- Produits laitiers
- Produits de la pêche et produits végétaux
- Ovoproduits
- Alimentation animale

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

L'étude a porté sur le protocole alternatif. Le tableau de résultats est présenté ci-dessous.

Protocole alternatif, hors prélèvements d'environnement (2004)
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 = 155 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 0 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 4 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 203 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

(3) dont un échantillon présumé positif par la méthode alternative, négatif après confirmation

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

Critères / protocole	Protocole Standard I	Protocole Simplifié I	Protocole alternatif	Protocole Standard II (viandes crues)	Protocole Simplifié II (viandes crues de boeuf)
Exactitude relative : AC	98,1%	97,4%	98,9%	98,9%	98,5%
Spécificité relative : SP	98,7%	98,7%	100%	100%	100%
Sensibilité relative : SE	97,4%	95,9%	97,5%	98,1%	96,9%

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) :

Tous produits	Méthode alternative (PA + PD) / (PA + PD + ND) =	Méthode de référence (PA + ND) / (PA + PD + ND) =
Protocole Standard I	97,5%	98,5%
Protocole Simplifié I	96,0%	98,5%
Protocole alternatif	97,4%	100%
Protocole Standard II (viandes crues)	98,1%	100%
Protocole Simplifié II (viandes crues de boeuf)	96,9 %	100%

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

Protocole Standard I

PD = 3 , ND = 5 donc Y = PD + ND = 8 ; $6 \leq Y \leq 22$ m = 3, M = 0 donc m > M

Protocole Simplifié I

PD = 3 , ND = 8 donc Y = PD + ND = 11 ; $6 \leq Y \leq 22$ m = 3, M = 0 donc m > M

Conclusion

Quelque soit le protocole utilisé, les deux méthodes ne sont pas différentes en termes statistiques.

NIVEAU DE DETECTION relatif

Comparaison des performances de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence

Des essais ont été effectués en 2007 et 2008, sur au total 6 combinaisons produits alimentaires/souches. Les produits ont été analysés 6 fois, par les deux méthodes (dont chacun des 4 protocoles pour la méthode alternative), à 4 niveaux de contamination.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Matrice	Souche	Niveau de détection relatif (UFC/25g) Avec intervalle de confiance(3) LOD ₅₀				Méthode de référence
		Méthode alternative				
		Protocole Standard I	Protocole Simplifié I	Protocole Standard II (viandes crues)	Protocole Simplifié II (viandes crues de boeuf)	
Steak haché	<i>S. Infantis</i>	0,6 [0,2 - 1,7]	0,6 [0,2 - 1,7]	–	–	0,6 [0,2 - 1,7]
		–	–	0,4 [0,1 - 1,4]	–	0,4 [0,1 - 1,4]
		–	–	–	0,2 [0,1 - 0,7]	0,2 [0,1 - 0,7]
Lait cru	<i>S. Typhimurium</i>	0,7 [0,3 - 2,0]	0,9 [0,3 - 2,8]	–	–	0,4 [0,1 - 1,7]
Filet de poisson	<i>S. Saintpaul</i>	0,5 [0,2 - 1,5]	0,8 [0,4 - 1,5]	–	–	0,5 [0,2 - 1,5]
Coule d'œuf	<i>S. Enteritidis</i>	0,5 [0,2 - 1,6]	0,5 [0,2 - 1,6]	–	–	0,5 [0,2 - 1,6]
Aliments pour animaux	<i>S. Agona</i>	0,3 [0,1 - 1,1]	0,2 [0,1 - 0,7]	–	–	0,3 [0,1 - 1,1]
Eau de process	<i>S. Derby</i>	0,4 [0,2 - 1,1]	0,4 [0,2 - 1,1]	–	–	0,4 [0,2 - 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 Used of a 50% Limit of detection Value in Defining Uncertainty Limits in the Validation of Presence-Absence Microbial detection Methods, Draft 10th December, 2003"

Des essais ont été effectués en 2004, sur 5 combinaisons produits alimentaires/souches. Les produits ont été analysés 6 fois, par les deux méthodes, à 4 niveaux de contamination.

Les résultats obtenus sont les suivants, pour le protocole alternatif :

Matrice	Souche	Niveau de détection relatif (UFC/25g) Avec intervalle de confiance(3) LOD ₅₀	
		Méthode alternative Protocole alternatif	Méthode de référence
Viande haché de volaille	<i>S. hadar</i>	0,7 [0,4 - 1,4]	0,7 [0,4 - 1,4]
Lait cru	<i>S. typhimurium</i>	0,5 [0,4 - 0,8]	0,4 [0,3 - 0,7]
Filet de poisson	<i>S. virchow</i>	0,4 [0,3 - 0,6]	0,4 [0,3 - 0,6]
Coule d'œuf	<i>S. enteritidis</i>	1,0 [0,5 - 2,2]	1,0 [0,5 - 2,2]
Aliments pour animaux	<i>S. seftenberg</i>	0,6 [0,4 - 1,0]	0,6 [0,4 - 1,0]

(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 Used 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

Globalement, la limite de détection de la méthode alternative se situe entre :

- 0,1 à 2,0 UFC/25 g avec le protocole Standard I,
- 0,1 à 2,8 UFC/25 g pour le protocole Simplifié I,
- 0,3 à 2,2 UFC/25g pour le protocole Alternatif,
- 0,1 à 0,7 UFC/25g pour le protocole Standard II (viandes crues),
- 0,1 et 0,7 UFC/25 g pour le protocole Simplifié II (viandes crues de bœuf).

La limite 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

Essais 2007 et 2008 :

- 156 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 156 testées, quelque soit le protocole de lyse utilisé.
- L'étude de 30 souches non *Salmonella* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées, quelque soit le protocole de lyse testé.

Essais 2004, avec le protocole alternatif :

- 51 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 51 testées, quelque soit le protocole utilisé.
- L'étude de 31 souches non *Salmonella* n'a pas mis en évidence la présence de réactions croisées, quelque soit le protocole testé.

PRATICABILITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

- **Délai d'obtention des résultats :**
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 3 à 6 jours avec la méthode alternative (*en incluant la confirmation selon les tests classiques de la méthode de référence, étape de purification incluse*) comme avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 1 jour, ou en 12 heures pour le protocole viandes crues, avec la méthode alternative contre 3 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 4 à 6 jours.
- **Formation du personnel :** un jour de formation est nécessaire pour un technicien qualifié en biologie moléculaire et microbiologie. Pour les techniciens non formés à la technique PCR, une formation initiale de 4 à 5 jours paraît nécessaire.

ETUDE INTERLABORATOIRE (étude de 2008)

L'étude interlaboratoire a été réalisée en **2008** avec **19 laboratoires** collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de **lait pasteurisé**, contaminés artificiellement avec une souche de *Salmonella typhimurium* aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC/25 ml
- 1 – 10 UFC/25 ml
- 5 – 50 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	152	144	80	76	76	4	4
1	152	144	80	0	0	80	80
2	152	144	80	0	0	80	80

* Un laboratoire a reçu les échantillons trop tard et n'a pas réalisé les analyses. Ces résultats n'ont pas été pris en compte.

** Les résultats de 8 laboratoires n'ont pas été exploités pour cause d'intercontamination (échantillons fortement contaminés)

Calculs

- L'exactitude relative est de **100%**
- La spécificité est de **95 %**
- La sensibilité est de **100 %**

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 inclue les positifs supplémentaires de la méthode alternative) :

Méthode alternative :

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

Méthode de référence :

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

Degré d'accord, concordance et odds ratio :

Degré d'accord : % de chances 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 répliquats donnent le même résultat pour chaque laboratoire.

Concordance : % de chances de trouver le résultat pour deux échantillons identiques analysés dans deux laboratoires différents (conditions de reproductibilité). C'est le % de toutes les paires de répliquats 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** et pour la **méthode de référence** :

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	92,5%	90,3%	1,00
L1	100%	100%	1,00
L2	100%	100%	1,00

Conclusion

La variabilité de la méthode alternative (degré d'accord, concordance, odds ratio) est identique 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