

Contact :

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

Ref. : SSO/NF102/Clients/3M Health Care/
Prolongation validation 2011 TECRA Unique Salmonella (R2)

Objet : NF VALIDATION

3M FRANCE
Monsieur Jean-François DAVID
Boulevard de l'Oise
95029 Cergy cedex
France

Saint-Denis, le 5 décembre 2011

Monsieur,

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

3M™ TECRA™ Unique Salmonella Test	Réf. TEC 24/3 – 12/03
--	------------------------------

arrivera à expiration le 12 décembre 2011 avant que les résultats de l'étude de reconduction ne puissent être présentés au Bureau Technique de la marque NF VALIDATION.

C'est pourquoi, suite à avis positif exprimé le 1^{er} décembre 2011 par le Bureau Technique de la marque NF VALIDATION, application à l'agroalimentaire, je vous accorde une prolongation du droit d'usage de la marque NF VALIDATION pour cette méthode jusqu'au 12 juin 2012.

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 : TEC – 24/3 – 12/03

Date de validation : 12.12.2003

Date de reconduction* : 04.12.2007

Fin de validité : 12.12.2011

** Le protocole NF EN ISO 16140 a été mis en œuvre en 2007 lors de la reconduction*

La Société **3M Health Care**
(siège social) Microbiology products
2501 Hudson Road
Building 275 5W 05
MN 55144 – IWO - St Paul –
USA

Distributeur **Laboratoires 3M Santé**
Département Microbiologie
Boulevard de l'Oise
95029 Cergy-Pontoise Cedex

Site de **3M Australia Pty Ltd**
production 13 Rodborough Road
FRENCHS FOREST NSW 2086
AUSTRALIE

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

3M™ Tecra™ Unique Salmonella Test

Référence du protocole : AV – 0144 – 1040 – 9

DOMAINE D'APPLICATION

Tous produits d'alimentation humaine et animale

RESTRICTIONS EVENTUELLES D'EMPLOI

Aucune

METHODE DE REFERENCE

NF EN ISO 6579 (2002) : Directives générales concernant les méthodes de recherche des *Salmonella*.

**Le Directeur Général Délégué
Jacques BESLIN**

AFAQ 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

Le test 3M™ TECRA™ Unique Salmonella est basé sur une réaction immuno-enzymatique permettant la détection des salmonelles mobiles et immobiles. Après un pré-enrichissement en eau peptonée tamponnée, les salmonelles de l'échantillon sont capturées par des anti-corps hautement spécifiques répartis sur un bâtonnet. Après lavage puis enrichissement, une réaction ELISA est appliquée. En présence de salmonelles, une coloration ombrage gris à violet apparaît sur les trois derniers quarts du bâtonnet, le premier quart servant de contrôle négatif.

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les échantillons positifs à l'issue de la méthode alternative doivent être confirmés à partir du bouillon d'enrichissement selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN, l'ISO ou l'AFNOR (en incluant l'étape de purification).

En cas de résultats discordants (positif par la méthode alternative, non confirmé par les tests décrits dans les méthodes normalisées par le CEN, l'ISO ou l'AFNOR, le laboratoire devra mettre en oeuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

NOTE

Depuis la première étude de validation réalisée en 2003, le protocole basé sur la norme EN ISO 16140 a été mis en oeuvre et le test 3M™ TECRA™ Unique Salmonella n'a pas été modifié.

L'ensemble de l'étude a donc été refaite, en conservant toutefois des résultats obtenus en 2003 pour l'étude d'exactitude, et en les complétant pour être conforme aux exigences de la norme EN ISO 16140. Les résultats globaux ont été interprétés selon ces exigences.

Le test 3M™ TECRA™ Unique Salmonella comprend deux protocoles distincts, qui ont été testés lors de l'étude de 2007 :

1. Protocole général avec pré-enrichissement en EPT modifiée à 37±1°C de 16 à 20 heures
2. Protocole spécifique pour les viandes crues, l'alimentation animale et les ovoproduits, comprenant un pré-enrichissement en EPT modifiée additionnée de 1/20 de supplément TECRA + 2,25 ml d'Imbentin AGS/35 chauffé à 42±1°C de 16 à 20 heures

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 2003 et 2007, sur un total de 329 échantillons de produits dont 44 naturellement contaminés, 124 artificiellement contaminés et 161 non contaminés, appartenant aux grandes catégories d'aliments suivantes :

Produits laitiers, produits carnés, produits de la mer et végétaux, 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 = 161 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 1 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 6 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 161 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

(2) et (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 = 98%**
- Spécificité relative : **SP = 99%**
Note : une spécificité relative inférieure à 100% résulte d'un nombre de positifs supplémentaires confirmés et non pas de faux positifs
- Sensibilité relative : **SE = 96%**

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 :
$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 96\%$	$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 99\%$

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

$$PD = 1, ND = 6 \text{ donc } Y = PD + ND = 7 ; 6 \leq Y \leq 22 \quad m = 1, M = 0 \text{ donc } m > M$$

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

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : produits laitiers, produits carnés, produits de la mer et végétaux, ovoproduits, 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
Viande hachée	S. Typhimurium	0,7 [0,4 – 1,3]	0,4 [0,2 – 0,8]
Saumon fumé	S. Enteritidis	1,1 [0,7 – 1,8]	0,7 [0,5 – 1,0]
Lait cru	S. Dublin	1,2 [0,6 – 2,4]	2,1 [1,0 – 4,3]
Œuf entiers	S. Enteritidis	1,3 [0,7 – 2,4]	1,0 [0,6 – 1,5]
Aliment pour chat	S. Infantis	1,1 [0,6 – 2,1]	0,9 [0,5 – 1,4]

(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 0,4 et 2,4 UFC/25 g.
Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,2 et 4,3 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

Inclusivité :

- 51 souches de *Salmonella* ont été testées. Une souche de *S. Paratyphi C* n'a pas été détectée quel que soit le protocole appliqué. Cinq souches de collection (*S. Gallinarum*, *S. Infantis*, *S. Paratyphi A*, *S. Senftenberg* et *S. Typhi*) ont donné un résultat négatif avec le protocole spécifique et positif avec le protocole général.
- Des essais complémentaires ont été réalisés sur des sérotypes non détectés, à des taux plus faibles, en testant le protocole spécifique en matrice lait, et le protocole général:
 - Une souche de **S. Senftenberg** et deux souches de **S. Paratyphi B** ont donné un résultat positif avec le protocole spécifique (en matrice lait)
 - Une souche de **S. Paratyphi A** et une souche de **S. Typhi** ne sont pas détectées avec le protocole spécifique mais le sont avec le protocole général à des taux plus faibles
 - Une souche de **S. Paratyphi C** n'a été détectée par aucun des protocoles
- Egalement, 4 souches sauvages de **S. Infantis** testées donnent un résultat positif avec le protocole général, mais un résultat négatif avec le protocole spécifique (un complément d'étude d'exactitude a pourtant montré que ces 4 souches, stressées, réagissaient avec le protocole spécifique sur matrice viande crue)
- 4 souches sauvages de **S. Gallinarum** ne sont pas détectées quel que soit le protocole utilisé, mais un résultat positif est obtenu lorsque le test est réalisé avec une suspension bactérienne de 10^7 UFC/ml environ. Ces 4 souches, testées stressées en matrice volaille crue, ont également donné un résultat négatif avec la méthode de référence.
- Deux souches de **S. Arizonae** ont aussi été testées et détectées quel que soit le protocole appliqué

Exclusivité :

- 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

- L'obtention des résultats **positifs** (incluant l'étape de confirmation) se fait en 4 à 6 jours avec le kit TECRA® UNIQUE SALMONELLA contre 5 à 7 jours avec la méthode de référence.
- L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 1 journée avec le kit TECRA® UNIQUE SALMONELLA contre 5 à 7 jours avec la méthode de référence.
- Dans le cas de résultats présumés positifs par la méthode TECRA® UNIQUE SALMONELLA mais rendus négatifs après confirmation, les résultats négatifs sont obtenus en 4 à 6 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* Enteritidis aux 3 niveaux suivants :

- niveau 0
- niveau légèrement supérieur au niveau de détection relatif
- niveau 10 fois supérieur au niveau précédent

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	104	80	78	79	2	1
1	112	104	80	4	2	76	78
2	112	104	80	0	0	80	80

* Un laboratoire a reçu les échantillons hors délai et n'a pas réalisé les analyses.

** Deux laboratoires ont trouvé chacun 8 résultats négatifs par la méthode de référence, à partir d'échantillons contaminés. Un laboratoire a trouvé 7 résultats positifs confirmés, par la méthode de référence, à partir d'échantillons non contaminés. Les résultats de ces trois laboratoires ont été exclus de l'interprétation statistique.

Calculs

- L'exactitude relative est de **96%**
- La spécificité est de **94%**
- La sensibilité est de **97%**

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 :

$$(PA + PD) / (PA + PD + ND) = 97,5\%$$

Méthode de référence :

$$(PA + ND) / (PA + PD + ND) = 97,0\%$$

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	98%	97%	1,5
L1	96%	95%	1,3
L2	100%	100%	1,0

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	96%	95%	1,3
L1	95%	90%	2,1
L2	100%	100%	1,0

Conclusion

La variabilité de la méthode alternative (degré d'accord, concordance, odds ratio) est comparable à celle de la méthode de référence, même si la différence est en faveur de la méthode alternative.

Il est souhaitable d'adresser à AFAQ 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