



**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 : GEN – 25/05 – 11/08

**Date de validation : 28.11.2008
Dates d'extension : 27.01.2009
04.02.2010
Fin de validité : 28.11.2012**

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

Pall GeneSystems
Centre d'affaires CICEA
1, rue du Courtil
F-35170 BRUZ

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

GeneDisc *Salmonella* spp.

Référence des protocoles :

Nom du produit	Référence SAP	Nouvelle version de la notice (SAP)	Ancienne version de la notice
Extraction Pack FOOD 1	PFOOD1100	PEFOOD_Salmo_01.FR	PEFOOD01/100_SIm.FR
GeneDisc <i>Salmonella</i> spp 06	GSLMSPP206006	GSLMSPP2_02.FR	SLMSPP2_02.FR
GeneDisc <i>Salmonella</i> spp 12	GSLMSPP212006		
GeneDisc Pathogenic <i>E.coli</i> O157 & <i>Salmonella</i> spp 06	GECOSLM206006	GECOSLM_01.FR	GDSTEC02_03.FR
GeneDisc Pathogenic <i>E.coli</i> O157 & <i>Salmonella</i> spp 12	GECOSLM 212006		

DOMAINE D'APPLICATION : Tous produits d'alimentation humaine et animale

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 de recherche GeneDisc *Salmonella* spp est un système automatisé et miniaturisé qui permet la détection de *Salmonella* spp par amplification génique par PCR en temps réel. Des sondes TaqMan® marquées par un fluorophore permettent de détecter les séquences nucléiques spécifiques du genre. Le signal est ensuite mesuré optiquement par les GeneDisc Cyclers 6 ou 12 secteurs d'analyse.

La méthode est basée sur l'utilisation :

- d'un pack d'extraction d'ADN bactérien (Extraction Pack FOOD 1), basée sur une lyse des cellules par traitement thermique ;
- des kits de détection par PCR en temps réel suivants :
 - GeneDisc *Salmonella* spp 06 et 12
 - GeneDisc *Pathogenic E.coli* O157 & *Salmonella* spp 06 et 12

La méthode GeneDisc *Salmonella* spp comporte trois protocoles : (i) viandes de bœuf crues ; (ii) produits laitiers ; (iii) toutes catégories alimentaires hors produits laitiers, tous validés dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION.

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 (eau peptonée tamponnée ± acriflavine, après isolement sur gélose nutritive) selon les tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification) ;
- Par isolement direct de 50µl d'enrichissement sur gélose chromogène Brilliance *Salmonella* ou sur une gélose sélective, suivi d'un test latex sur colonie ;
- Par repiquage en bouillon RVS et isolement sur gélose Brilliance *Salmonella* ou sur une gélose sélective, suivi d'un test latex sur colonies.

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.

Historique de validation

1/ En janvier 2009, la validation a été étendue à deux nouvelles versions de GeneDisc, comportant 12 secteurs d'analyse, permettant de réaliser les analyses en simplex (1 puits PCR par cible PCR) :

- GeneDisc pathogenic *E.coli* O157 & *Salmonella* spp (GDSTEC02-12)
- GeneDisc *E.coli* O157 & *Salmonella* spp (GDSTEC03-12)

Des performances comparables ont été obtenues avec ces nouveaux GeneDisc, par rapport aux versions GDSTEC02-06 et GDSTEC03-06 (analyses en duplicate). Les résultats ne sont pas détaillés dans la présente attestation.

2/ En février 2010, des essais complémentaires tierce-partie ont permis de valider un nouveau protocole « toutes catégories alimentaires (hors produits laitiers) ». Le champ d'application AFNOR VALIDATION de la méthode GeneDisc *Salmonella* spp est ainsi étendue à l'analyse de tous produits d'alimentation humaine et animale.

Les paramètres suivants ont été testés : exactitude/spécificité/sensibilité relative. Les résultats de cette étude ont été compilés à ceux obtenus lors des précédentes études de validation (cf. 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 2008, puis en 2010 sur au total 447 échantillons de produits dont 42 naturellement contaminé, 166 artificiellement contaminés et 239 non contaminés, appartenant aux grandes catégories suivantes : produits carnés, produits laitiers, ovoproduits, produits de la pêche et végétaux, et produits d'alimentation animale.

Les GeneDisc (GD) STEC02-06 et STEC03-06 ont été mise en œuvre avec chacun des protocoles testés. Les résultats obtenus ont été compilés.

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

Tableau de résultats – Protocole court en 10h±2h (viandes crues de bœuf)

(Cf. tableau 1 de la norme NF EN ISO 16140)

Réponses	GeneDisc STEC02-06 et STEC03-06 (résultats confondus)	
	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 32 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 2 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 2 ⁽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 2 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

Tableau de résultats – Tous protocoles en 18h±2h confondus (produits laitiers ; toutes catégories alimentaires hors produits laitiers)

(Cf. tableau 1 de la norme NF EN ISO 16140)

Réponses	GeneDisc STEC02-06 et STEC03-06 (résultats confondus)	
	Méthode de référence positive (R+)	Méthode de référence négative (R-)
Méthode alternative positive (A+)	Accord positif A+ / R+ PA = 162 ⁽¹⁾	Déviations positives A+ / R- PD = 5 ⁽¹⁾
Méthode alternative négative (A-)	Déviations négatives A- / R+ ND = 5 ⁽²⁾	Accord négatif A- / R- NA = 205 ⁽³⁾

(1) il s'agit de positifs confirmés

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

(3) dont 4 échantillons présumés positifs par la méthode alternative, négatifs après confirmation

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

	Exactitude relative AC (%)	Spécificité relative SP (%)	Sensibilité relative SE (%)
Protocole court "viandes crues de bœuf"	94,3%	94,4%	94,1%
Tous protocoles confondus (hors protocole court ci-dessus)	97,3%	97,6%	97,0%

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) :

	Méthode alternative (PA + PD) / (PA+ PD + ND) =	Méthode de référence (PA + ND) / (PA+ PD + ND) =
Protocole court "viandes crues de bœuf"	94,4%	94,4%
Tous protocoles confondus (hors protocole court ci-dessus)	97,1 %	97,1 %

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

Protocole court "viandes crues de bœuf"

PD = 2 , ND = 2 ; Y = PD + ND = 4 ; Y < 6 ; Aucun test statistique n'est disponible.

Tous protocoles confondus (hors protocole court "viandes crues de bœuf")

PD = 5 , ND = 5 ; Y = PD + ND = 10 ; $6 \leq Y \leq 22$; m = 5 ; M = 1 donc m > M

Conclusion

Quels que soient les protocoles testés, les performances de la méthode GeneDisc *Salmonella* spp. apparaissent équivalentes à celles de la méthode de référence.

NIVEAU DE DETECTION relatif

Comparaison des performances de la méthode alternative et de la méthode de référence

Des essais ont été effectués en 2008, puis en 2010, sur au total les 6 combinaisons produits alimentaires/souches décrites dans le tableau ci-dessous.

Ces produits représentent les catégories suivantes d'aliments : produits carnés, produits laitiers, ovoproduits, produits végétaux et de la pêche, et produits d'alimentation animale.

Le produit a été analysé **6 fois**, par les **deux méthodes**, à **4 niveaux** de contamination.

Les résultats obtenus sont les suivants (pour GDSTEC02-06 et GDSTEC03-06) :

Matrice	Souche	Niveau de détection relatif LOD ₅₀ (3) Avec intervalle de confiance (UFC/25g ou 25 ml)	
		Méthode alternative	Méthode de référence
Farce	<i>Salmonella</i> Virchow 14	0,3 [0,1 – 0,8]	0,3 [0,1 – 0,8]
Lait cru	<i>Salmonella typhimurium</i> 305	0,8 [0,6 – 1,0]	0,5 [0,2 – 1,4]
Steak haché	<i>Salmonella infantis</i> 128	0,3 [0,1 – 1,0]	0,2 [0,1 – 0,8]
Coule d'œuf	<i>Salmonella</i> Enteritidis 657	0,6 [0,2 – 1,8]	0,6 [0,2 – 1,8]
Epinard crus	<i>Salmonella</i> Virchow F276	0,2 [0,1 – 0,6]	0,2 [0,1 – 0,6]
Produits d'alimentation animale	<i>Salmonella</i> Agona A00VO38	0, 2 [0,1 – 0,6]	0,2 [0,1 – 0,6]

(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 2,2 UFC/25 g.
Le niveau de détection de la méthode de référence se situe entre 0,1 et 1,4 UFC/25 g.

INCLUSIVITE/EXCLUSIVITE

Mise en oeuvre de la méthode alternative seulement

Pour cette étude, seul le GeneDisc STEC03-06 a été testé.

- Deux protocoles ont été testés pour l'inclusivité :
 - enrichissement 10 h ± 2 h à 37°C ± 1°C : 48 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 50 testées. Dans le cas du protocole « viandes crues de bœuf », une souche de *Salmonella* Wayne a donné un test PCR négatif et une souche de *Salmonella* houtenae a donné un test latex négatif.
 - enrichissement 18 h ± 2 h à 37°C ± 1°C : 50 souches de *Salmonella* ont été détectées sur 50 testées.
- L'étude de 31 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** (identiques pour tous les GeneDisc) :
 - L'obtention des résultats **positifs** se fait en 2 à 4 jours avec la méthode alternative contre 5 à 8 jours avec la méthode de référence.
 - L'obtention des résultats **négatifs** se fait en 1 jour 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 2 à 4 jours.

ETUDE INTERLABORATOIRE

L'étude interlaboratoire a été réalisée en 2008 avec 12 laboratoires collaborateurs. Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de steak haché, contaminés artificiellement avec une souche de sérotype *Salmonella typhimurium* aux 3 niveaux suivants :

- 0 UFC/25g
- 1 – 10 UFC/25g
- 5 – 50 UFC/25g

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	96	96	88	88	88	0	0
1	96	96	88	0	0	88	88
2	96	96	88	0	0	88	88

* Les résultats d'un laboratoire ont été exclus pour cause d'intercontamination des échantillons.

Calculs

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

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) :

$$\text{Méthode alternative :} \\ (PA + PD) / (PA + PD + ND) = 100\%$$

$$\text{Méthode de référence :} \\ (PA + ND) / (PA + PD + ND) = 100\%$$

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 :

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

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

Niveau de contamination	Degré d'accord	Concordance	COR
L0	100%	100%	1,0
L1	100%	100%	1,0
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	100%	100%	1,0
L1	100%	100%	1,0
L2	100%	100%	1,0

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